

**Aus der Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde  
der Universität Würzburg**

**Direktor: Professor Dr. med. Christoph Härtel**

**Der Einfluss von Th17-stimulierenden, Interleukin-17  
und Interleukin-17-inhibierenden Faktoren auf in vitro  
Funktion und Phänotyp regulatorischer T-Zellen bei  
gesunden Probanden und Patienten mit Juveniler  
Idiopathischer Arthritis**

**Inauguraldissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Marie-Therese Holzer**

**aus Augsburg**

**Würzburg, Oktober 2022**

**Referentin:** Prof. Dr. med. Martina Prelog

**Korreferent:** Prof. Dr. med. Thomas Alexander Kerkau

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 26.04.2023

**Die Promovendin ist Ärztin.**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Immunologische Grundlagen	1
1.1.1	T-Zellen	2
1.1.1.1	T-Zell-Entwicklung	2
1.1.1.2	T-Zell-Differenzierung	4
1.1.1.3	T-Zell-Populationen	5
1.1.2	Regulatorische T-Zellen (Tregs)	7
1.1.2.1	Entwicklung der Tregs	8
1.1.2.2	Suppressionsfähigkeit der Tregs	10
1.1.2.3	FoxP3-Expression auf Tregs	12
1.1.3	Th17-Zellen	13
1.1.4	Plastizität von CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen	15
1.1.4.1	Th17-Plastizität	15
1.1.4.2	Treg-Plastizität	16
1.1.4.3	Treg-Th17-Plastizität	17
1.2	IL-17	19
1.2.1	IL-17 in Autoimmunerkrankungen	19
1.3	Juvenile Idiopathische Arthritis (JIA)	20
1.3.1	Klassifikation und Klinik	21
1.3.2	Ätiologie	23
1.3.3	Pathophysiologie	24
1.3.4	Diagnostik	25
1.3.5	Therapie	26
1.4	Autoimmunität am Beispiel der JIA	28
1.4.1	Einfluss der Tregs und Th17-Zellen auf autoimmune Erkrankungen	30
1.4.2	IL-17-Inhibition als Therapieansatz bei Autoimmunerkrankungen	31
<b>2</b>	<b>Zielsetzung und Fragestellung</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>35</b>
3.1	Material	35
3.1.1	Geräte	35
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	37
3.1.3	Isolierungskit	39
3.1.4	Antikörper, Zytokine, Stimulantien, Hemmstoffe und weitere chemische Verbindungen	39
3.1.5	Antikörper zur Zellfärbung	40
3.1.6	Lösungen und Medien	42

3.1.7	Chemikalien und Gase	43
3.2	Methoden	44
3.2.1	Ethikvotum	44
3.2.2	Studiendesign	45
3.2.3	Probanden	45
3.2.3.1	JIA-Probanden	45
3.2.3.2	Kontrollprobanden	46
3.2.4	Ficoll Dichtegradientenzentrifugation	46
3.2.5	Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer	48
3.2.6	Einfrier- und Auftauverfahren sowie Kryokonservierung	49
3.2.7	Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) Treg-Isolierung	49
3.2.8	Reinheitmessung der isolierten Tregs	51
3.2.9	In vitro Kultur der Tregs und Treg-Charakterisierung	52
3.2.10	PBMC-Charakterisierung	54
3.2.11	Durchflusszytometrie	56
3.2.11.1	Oberflächenfärbung	60
3.2.11.2	Intrazelluläre Färbung	60
3.2.11.3	Auswertung mithilfe der FACS-Diva Software	61
3.2.12	Suppressions-Assay	62
3.2.13	Statistische Auswertung	66
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>68</b>
4.1	Relevante Vorversuche vor Durchführung der Kulturversuche	68
4.1.1	Prestimulationsversuch der Tregs	68
4.1.2	Ermittlung der optimalen Zellstimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 für die Suppressions-Assays	69
4.2	Probandencharakterisierung	71
4.3	PBMC-Charakterisierung	74
4.3.1	Charakterisierung der Probandengruppen für die PBMC-Charakterisierung	74
4.3.1.1	Charakterisierung der Patientenkohorte	74
4.3.2	Analyse des allgemeinen T-Zell-Lymphozytenpools	76
4.3.2.1	Reife- und Aktivitätsgrad der CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen	80
4.3.2.2	Reife- und Aktivitätsgrad der CD8 <sup>+</sup> -Zellen	83
4.3.3	Analyse der zytotoxischen Charakteristika im Lymphozytenpool	85
4.3.3.1	Zytotoxische Charakteristika in stimulierten Zellen	85
4.3.3.2	Zytotoxische Charakteristika in unstimulierten Zellen	90
4.3.4	Analyse der Th1-Zell- und Th17-Zell-Verteilung im Lymphozytenpool	95



4.3.4.1	Zytokinproduktion in der CD4 <sup>+</sup> -Zellpopulation sowie CCR6 <sup>+</sup> und CD161 <sup>+</sup> -Zellen und deren Zytokinproduktion in der CD4 <sup>+</sup> -Zellpopulation	98
4.3.4.2	Beschreibung der CD8 <sup>+</sup> -Zellpopulation bezüglich Th1 und Th17-Charakteristika	100
4.3.5	Analyse der Tregs im Lymphozytenpool	102
4.3.5.1	Treg-Charakteristika der CD4 <sup>+</sup> -Zellen	104
4.3.5.2	Treg-Charakteristika der CCR6 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Zellen	106
4.3.5.3	Treg-Charakteristika der CD8 <sup>+</sup> -Zellen und CCR6 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> -Zellen	107
4.3.6	Analyse der Treg/Th17-Balance	109
4.3.6.1	Th17-Charakteristika der CD4 <sup>+</sup> -Zellen und FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Zellen	112
4.4	Treg-Charakterisierung	114
4.4.1	Charakterisierung der Probandengruppen für die Treg-Charakterisierung	128
4.4.1.1	Charakterisierung der Patientenkohorte	128
4.4.2	Einfluss der Stimuli auf Phänotyp und funktionale Eigenschaften der Tregs in der JIA-Gruppe	129
4.4.2.1	FoxP3 <sup>+</sup> -Zellen in der CD4 <sup>+</sup> -Population	129
4.4.2.2	CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> -Zellen in der FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Population und CD4 <sup>+</sup> -Population	130
4.4.2.3	CCR6 <sup>+</sup> -Zellen in der FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Population und CD4 <sup>+</sup> -Population	131
4.4.2.4	IL-17 <sup>+</sup> -Zellen in der CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Population, CCR6 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Population und FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Population	133
4.4.2.5	IL-17 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> -Zellen in der CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Population, CCR6 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Population und FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Population	134
4.4.3	Einfluss der Stimuli auf Phänotyp und funktionale Eigenschaften der Tregs in der Kontrollgruppe	134
4.4.3.1	FoxP3 <sup>+</sup> -Zellen in der CD4 <sup>+</sup> -Population	134
4.4.3.2	CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> -Zellen in der FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Population und CD4 <sup>+</sup> -Population	135
4.4.3.3	CCR6 <sup>+</sup> -Zellen in der FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Population und CD4 <sup>+</sup> -Population	136
4.4.3.4	IL-17 <sup>+</sup> -Zellen in der CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Population, CCR6 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Population und FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Population	137
4.4.3.5	IL-17 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> -Zellen in der CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Population, CCR6 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Population und FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Population	138
4.4.4	Vergleich der Treg-Charakterisierungen der beiden Gruppen	139
4.4.4.1	FoxP3 <sup>+</sup> -Zellen in der CD4 <sup>+</sup> -Population	139
4.4.4.2	CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> -Zellen in der FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Population und CD4 <sup>+</sup> -Population	140
4.4.4.3	CCR6 <sup>+</sup> -Zellen in der FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Population und CD4 <sup>+</sup> -Population	140
4.4.4.4	IL-17 <sup>+</sup> -Zellen in der CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Population, CCR6 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Population und FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Population	141
4.4.4.5	IL-17 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> -Zellen in der CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Population, CCR6 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Population und FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Population	141
4.5	Suppressions-Assay	143

4.5.1	Charakterisierung der Probandengruppen für die Suppressions-Assays	145
4.5.1.1	Charakterisierung der Patientenkohorte	145
4.5.2	Einfluss der Stimuli auf die Suppressionsfähigkeit der Tregs in der JIA-Gruppe	146
4.5.3	Einfluss der Stimuli auf die Suppressionsfähigkeit der Tregs in der Kontrollgruppe	151
4.5.4	Vergleich der Suppressions-Assays der beiden Gruppen	156
4.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	159
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>163</b>
5.1	Interpretation der Unterschiede im Lymphozytenpool zwischen den einzelnen Proben Gruppen	163
5.1.1	Unterschiede im allgemeinen T-Zell-Lymphozytenpool	163
5.1.2	Unterschiede bzgl. der Zytotoxizität der Lymphozyten	164
5.1.2.1	Unterschiede nach PMA/Ionomycin/Brefeldin A-Stimulation	164
5.1.2.2	Einfluss der unspezifischen Stimulation auf die Ergebnisse	166
5.1.3	Unterschiede der Th1-/Th17-Verteilung	167
5.1.4	Unterschiede im Phänotyp der regulatorischen T-Zellen	169
5.1.5	Unterschiede der Treg/Th17-Balance	171
5.2	Interpretation des Einflusses der Stimuli auf den Phänotyp der Tregs	173
5.2.1	Interpretation des Vergleichs der Stimulieinflüsse auf die Proben Gruppen	175
5.2.1.1	Vergleich der Treg-Marker	175
5.2.1.2	Vergleich der proinflammatorischen Zytokine in Tregs	178
5.3	Interpretation des Einflusses der Stimuli auf Suppressionsfähigkeit der Tregs	180
5.4	Interpretation des Einflusses der Medikation auf die Ergebnisse	185
5.5	Limitationen der Studie	188
5.5.1	Probandenabhängige Limitationen	188
5.5.2	Methodenabhängige Limitationen	189
5.5.2.1	Zellgewinnung und MACS-Separation	189
5.5.2.2	Zellkultur	189
5.5.2.3	Durchflusszytometrie	191
5.6	Konklusion	191
5.7	Ausblick	193
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>196</b>

<b>7</b>	<b>Abstract</b>	<b>197</b>
<b>8</b>	<b>Literatur</b>	<b>199</b>
	<b>Appendix</b>	

In dieser Arbeit wird die männliche Form im Singular und ein möglichst geschlechtsneutraler Plural für sowohl Proband:innen und Patient:innen jedweden Geschlechts verwendet (beispielsweise Patient, Patienten).

# 1 Einleitung

## 1.1 Immunologische Grundlagen

Die Aufgabe des Immunsystems besteht in der Abwehr von fremden und/oder infektiösen Substanzen, wie beispielsweise pathogenen Mikroorganismen. Elementar für diese Abwehr ist das Erkennen und Beseitigen der fremden Zellen oder Moleküle, was jedoch gleichzeitig eine genaue Unterscheidung zu körpereigenen Zellen erfordert. Scheitert diese Unterscheidungsfähigkeit und folglich die Toleranz des Immunsystems dem eigenen Körper gegenüber, so reagiert es autoreaktiv. Komponenten des Immunsystems wenden sich gegen Autoantigene – man spricht von Autoimmunität. Daraus entstehende Erkrankungen werden Autoimmunerkrankungen genannt.

Das Immunsystem besteht aus zwei Kompartimenten, die miteinander agieren. Das angeborene und das adaptive Immunsystem. Ersteres ist von Geburt an funktionsfähig und beinhaltet neben den physikalischen und chemischen Barrieren des Menschen (wie beispielsweise Haut und Schleimhäute) eine humorale und eine zellvermittelte Komponente. Humorale Stoffe sind beispielsweise das Komplementsystem oder Opsonine, zelluläre Bestandteile des angeborenen Immunsystems hingegen sind Phagozyten wie Neutrophile oder Makrophagen, Natural Killer-Zellen (NK-Zellen) und dendritische Zellen. Dendritische Zellen fungieren als Bindeglied zwischen den beiden Immunsystemkomponenten und aktivieren T-Zellen aus dem adaptiven Immunsystem [1].

Das adaptive Immunsystem reagiert zwar zunächst nicht so schnell wie das angeborene, jedoch hat es den großen Vorteil einer präziseren und spezifischeren Immunantwort sowie des Aufbaus eines immunologischen Gedächtnisses. Auch dieses Kompartiment besteht aus einem humoralen Sektor, der durch B-Zellen und die von ihnen gebildeten Antikörper formiert wird; und einem zellvermittelten Teil, der durch T-Lymphozyten gebildet wird. Beide Lymphozytenreihen bilden Gedächtniszellen (Memory-Zellen) aus, die für eine

anhaltende Immunität sorgen und bei erneutem Kontakt mit dem jeweiligen Antigen zu Effektor-Zellen differenzieren [2].

### 1.1.1 T-Zellen

T-Zellen sind Lymphozyten, die im Knochenmark entstehen und im Thymus heranreifen. Alle diese Zellen besitzen einen T-Zell-Rezeptor (TCR), meist bestehend aus einem  $\alpha\beta$ -Heterodimer (mit Ausnahme der  $\gamma\delta$ -T-Zellen, die ein  $\gamma\delta$ -Heterodimer als TCR besitzen). Mit ihm können für jede T-Zelle spezifische Antigene, präsentiert auf MHC-Molekülen (Major Histokompatibilitäts-Komplex) sogenannter (sog.) APCs (Antigen präsentierende Zellen), erkannt werden. T-Zellen besitzen außerdem einen TCR-Komplex, bestehend aus dem TCR, CD3-Molekülen (CD, Cluster of differentiation) und  $\xi$ -Proteine, welche wichtig für die Signaltransduktion des TCRs in das Innere der T-Zelle sind [3].

#### 1.1.1.1 T-Zell-Entwicklung

In der Entwicklung der T-Zelle ist die Rekombination und Umlagerung der TCR-Gene ein essenzieller Schritt für die Diversität der TCR selbst, was eine unglaubliche Vielzahl an potenziell erkennbaren MHC-präsentierten Antigenen ermöglicht. Um die Gefahr einer autoimmunen Reaktion zu verringern, wird bei der Reifung der T-Zellen im Thymus eine Selektion der T-Zell-Vorläufer durchgeführt. Die T-Zellen exprimieren zunächst CD4 und CD8 als Corezeptoren des TCRs. In der Positivselektion wird nun überprüft, ob diese Rezeptoren MHC-Moleküle erkennen können; ist dies nicht der Fall, geht die Zelle in Apoptose. Falls die Zelle diesen Prozess jedoch überlebt, beendet sie die Expression von CD4 oder CD8 und wird so von der doppelt positiven zur einfach positiven Zelle. Wurde in der Positivselektion ein MHC-I-Molekül erkannt, so entwickelt sich eine CD8<sup>+</sup>-Zelle, bei Erkennung eines MHC-II-Moleküls eine CD4<sup>+</sup>-Zelle. CD4<sup>+</sup>-Zellen werden als T-Helferzellen bezeichnet und können als spätere Effektor-Zellen die Komponenten des angeborenen Immunsystems (z.B. Makrophagen) und des adaptiven Immunsystems (z.B. B-Zellen) aktivieren. CD8<sup>+</sup>-Zellen werden als zytotoxische T-Zellen bezeichnet und können als spätere Effektor-Zellen infizierte körpereigene Zellen abtöten. Im nächsten Schritt der Negativselektion

werden Zellen eliminiert, die mit zu hoher Affinität an durch MHC-Moleküle präsentierte Selbstantigene binden. Dieser Schritt ist besonders wichtig, um eine immunologische Toleranz zu gewährleisten und Autoimmunität zu verhindern [3, 4]. Es wird angenommen, dass die Untergruppe der CD4<sup>+</sup>-Zellen, die zwar eine hohe Selbstantigenaffinität zeigt, jedoch zufälligerweise ein Umgebungsmilieu mit IL-2 (Interleukin-2) oder TGFβ antrifft, statt Apoptose den Weg der natürlichen regulatorischen T-Zelle (Tregs) einschlägt und beginnt den Transkriptionsfaktor Forkhead Box Protein 3 (FoxP3) zu exprimieren. Zellen, die nur eine mittlere Selbstantigenaffinität besitzen, werden je nach Zytokinmilieu zur gewöhnlichen CD4<sup>+</sup>-Zelle oder zur Treg-Zelle (unter IL-2-Einfluss) [5, 6].

Naive T-Zellen zirkulieren nach Verlassen des Thymus ständig zwischen sekundär lymphatischen Organen und peripherer Blutbahn. Das sog. Homing zu den Lymphknoten erfolgt unter anderem durch CCR7, einen Chemokinrezeptor auf den zurückkehrenden Lymphozyten, der die Chemokine CCL19 und CCL21, welche in lymphatischen Gefäßen und den Lymphknoten produziert werden, bindet [3, 7]. In den sekundär lymphatischen Organen befinden sich die APCs, welche für die Aktivierung der naiven T-Zellen nötig sind. APCs aus beispielsweise Haut und Schleimhaut migrieren nach Phagozytose eines Pathogens in die nächstliegenden sekundär lymphatischen Organe und präsentieren dort das phagozytierte Antigen den durchströmenden T-Zellen solange, bis dieses von einer T-Zelle mit entsprechendem TCR erkannt wird [4]. Für die endgültige Aktivierung der naiven T-Zellen ist neben der Antigenerkennung auch eine Costimulation erforderlich. Meist erfolgt dies über den Oberflächenrezeptor der T-Zellen CD28, welcher mit dem entsprechenden Molekül B7 der APCs interagiert und in den T-Zellen folgende Prozesse in Gang setzt: Generierung von Überlebenssignalen an die T-Zelle selbst, Steigerung der Proliferation und metabolischen Aktivität, Zytokinproduktion (z.B. IL-2, einem Überlebens-, Wachstums- und Differenzierungszytokin) sowie Differenzierung der naiven T-Zelle in sog. Effektor- oder Memory-Zellen. Inhibiert wird diese Aktivierung beispielsweise durch das von aktivierten T-Zellen produzierte Protein CTLA-4, welches ebenfalls B7 bindet und daher eine Rolle in den Aspekten der Toleranz und der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen spielt. Die Effektor-

und Memory-Zellen selbst sind weniger auf die costimulatorische Aktivierung angewiesen und können dadurch auch von APCs im Gewebe selbst, die weniger B7 exprimieren, aktiviert werden [3, 8].

### 1.1.1.2 T-Zell-Differenzierung

Sich differenzierende T-Zellen werden häufig in 4 Subpopulationen unterteilt, die anhand verschiedener Oberflächenmarker gebildet werden. Die Naiven-, die Memory- (auch: Gedächtniszellen), die Effektor- (auch: Effektor-Zellen) und die TEMRA-Zellen („Terminally differentiated effector memory cells re-expressing CD45RA, auch: Terminale Effektor Memory-Zellen) (vergleiche (vgl.) Tabelle 1) [9, 10].

**Tabelle 1: Differenzierungsgrade der T-Zellen und Unterteilung in Subpopulationen anhand der Oberflächenmoleküle**

Oberflächenmolekül	Naive	Memory	Effektor	TEMRA
CD27	++	+++	+/-*	-
CD45RA	+	-	-	+
CD28	++	+++	+/-*	-
CCR7	+	+	-	-
CD45RO	-	+	+	+/-

\*In dieser Arbeit werden aufgrund der besseren Einteilbarkeit CD27<sup>-</sup> und CD28<sup>-</sup> T-Lymphozyten als Effektor-Zellen bezeichnet.

Erstellt nach Appay et al. und Larbi et al. [9, 10].

Naive Zellen besitzen noch die Fähigkeit in die sekundär lymphatischen Organe zu rezirkulieren (CCR7<sup>+</sup>) und benötigen für ihr Überleben IL-7 (CD127<sup>+</sup>). Sie sind Antigen-unerfahren und besitzen CD45RA. Nach Antigen-Kontakt und Aktivierung verlieren sie dieses Molekül im Austausch mit der kleineren CD45-Isoform CD45RO. Terminal differenzierte Zellen exprimieren erneut das CD45RA-Molekül. Während Memory-Zellen noch stetig in Lymphknoten rezirkulieren, haben Effektor- und TEMRA-Zellen diesen Homingfaktor verloren (CCR7<sup>-</sup>). Sie können trotz ihrer CD28-Negativität von APCs aktiviert werden und sind essenziell für die schnelle Immunantwort am Ort des Geschehens. Memory-Zellen haben eine niedrige IL-2-Rezeptor Expression (= CD25) bei gleichzeitig hoher IL-7-Rezeptor-Expression (= CD127), was sie zu einer wenig proliferierenden, dafür aber sehr langlebigen T-Zell-Subpopulation macht. Effektor-Zellen hingegen exprimieren viel CD25 und wenig CD127, was

gleichbedeutend mit einer hohen Proliferationsrate (IL-2 wirkt proliferativ) und relativer Kurzlebigkeit (IL-7 als starker Überlebensfaktor) ist [3].

#### 1.1.1.3 *T-Zell-Populationen*

Die großen Populationen der T-Zellen sind die CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen, die CD8<sup>+</sup>-Zytotoxischen Zellen, die Natürlichen Killer-T-Zellen (NKT), die  $\gamma\delta$ -T-Zellen und die Tregs.

Die NKT-Zellen exprimieren CD56, ein Oberflächenmarker, der auch auf Natürlichen Killer-Zellen zu finden ist und sezernieren die Zytokine IL-4 und IFN $\gamma$ . Die  $\gamma\delta$ -T-Zellen sind ähnlich wie NKT-Zellen nicht an MHC-Molekülexpression der APCs gebunden, sondern erkennen eine Vielzahl anderer Proteine oder Lipide. Eine Assoziation zur Psoriasis-Genese und der dortigen IL-17-Produktion wird diskutiert [11]. Die CD4<sup>+</sup>-Tregs entstehen unter Einfluss von TGF $\beta$  und IL-2 durch Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT5 (STAT, signal transducer and activator of transcription) und FoxP3 (Forkhead Box Protein 3), produzieren selbst IL-10 und TGF $\beta$  und sind erforderlich, um eine überschießende Inflammationsreaktion abzuwehren. Sie werden im nächsten Unterkapitel (vgl. 1.1.2) näher betrachtet. CD8<sup>+</sup>-Zellen gliedern sich grob wie bereits erwähnt in die Naive-Population, die Memory-, die TEMRA- und die Effektor-Population, welche die sog. CTLs (CD8<sup>+</sup>-zytotoxische-T-Lymphozyten) beinhaltet. Die CD4<sup>+</sup>-Effektor-Zellen werden im Folgenden näher beschrieben. Durch zellvermittelte Immunitätsmechanismen helfen sie dabei, über Aktivierung von B-Zellen und der daraus folgenden spezifischen Antikörperproduktion sowie über Produktion von phagozytenaktivierenden Zytokinen die angeborene und adaptive Immunantwort zu verstärken. Sie können anhand ihrer Zytokinproduktion in drei weitere größere Subpopulationen eingeteilt werden: Th1-Zellen, Th2-Zellen und Th17-Zellen. Auf die letzte Untergruppe wird im Laufe der Arbeit nochmals ausführlicher eingegangen (vgl. Kapitel 1.1.3). Zu bemerken ist, dass die Einteilung in diese drei Populationen lediglich schematisch erfolgt. Erwähnt sei hier auch die Plastizität, die die T-Zell-Subpopulationen mit sich bringen, wie etwa die Fähigkeit der Th17-Zellen sich in andere Zelllinien wie Th1-Zellen umzuwandeln (Th17/Th1-Zellen, die gleichzeitig IL-17 und IFN $\gamma$  produzieren und sowohl den



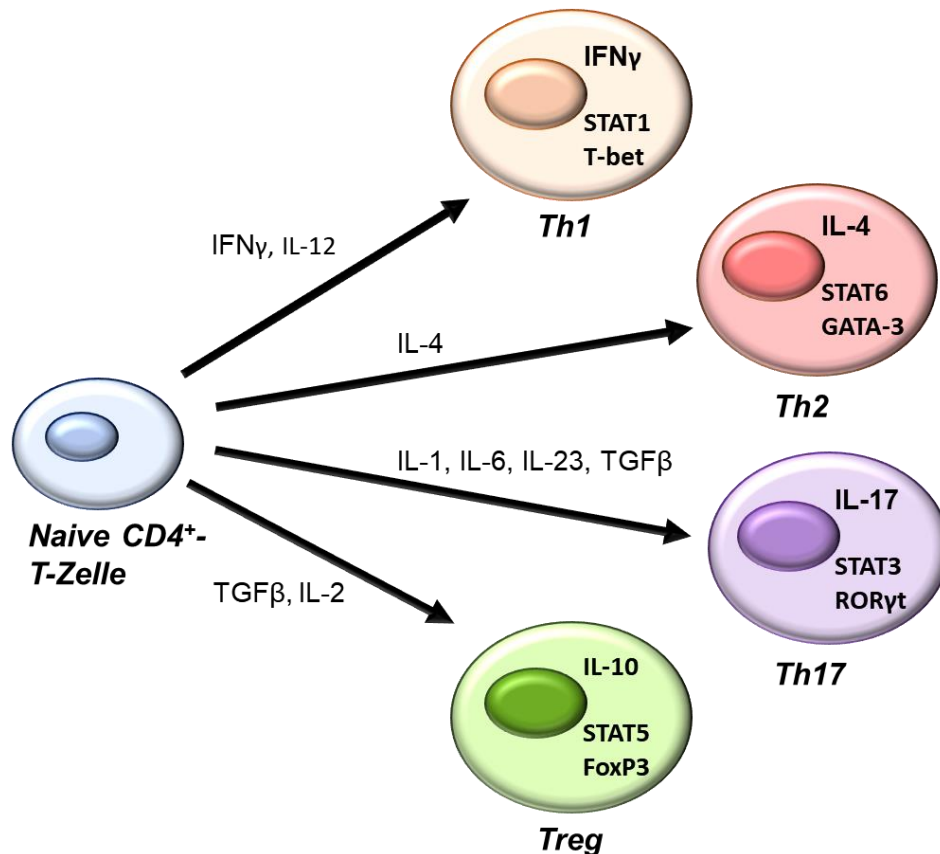
Th17-spezifischen Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t (RAR-related orphan receptor  $\gamma$ t), als auch den Th1-spezifischen Transkriptionsfaktor T-bet (T-Box-Transkriptionsfaktor TBX21) exprimieren) [12]. Eine zusammenfassende Beschreibung von Entwicklung, Funktion und Eigenschaften dieser Zelltypen ist in Tabelle 2 dargestellt [3, 10].

**Tabelle 2: Vergleich der Effektor-CD4<sup>+</sup>-Zellen**

	<b>Th1</b>	<b>Th2</b>	<b>Th17</b>
<b>Entwicklung aus naiven T-Zellen durch Einfluss von</b>	IFN $\gamma$ , IL-12	IL-4	IL-1, IL-6, IL-23, TGF $\beta$
<b>Produzierte Zytokine</b>	v.a. IFN $\gamma$ auch: TNF $\alpha$ , IL-10	IL-4, IL-5, IL-13	IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-21
<b>Exprimierte Oberflächenmoleküle (Chemokin-Rezeptoren für Homing)</b>	CXCR3, CCR5	CCR3, CCR4, CCR8	CCR6
<b>Transkriptionsfaktoren</b>	T-bet, STAT1, STAT4	GATA-3, STAT6	ROR $\gamma$ t, STAT3
<b>Aktivierung von</b>	Makrophagen, B-Zellen (IgG-Produktion)	Mastzellen, Eosinophilen, Makrophagen, B-Zellen (IgE-Produktion)	Neutrophilen, Monozyten
<b>Abwehr von</b>	Intrazellulären Erregern	Wurmerkrankungen	Extrazellulären Erregern
<b>Assoziierte Erkrankungen</b>	Autoimmunerkrankungen, Gewebeschäden bei chron. Entzündung	Allergien	Autoinflammatorische und Autoimmunerkrankungen

Erstellt nach Abbas et al. und Appay et al. [3, 10]

Die Entwicklung dieser drei Zellpopulationen aus der naiven CD4<sup>+</sup>-Zelle erfolgt abhängig von dem vorherrschenden Zytokinmilieu, welches von der APC, die für die Aktivierung der T-Zelle verantwortlich war, produziert wird. Jede Zellpopulation produziert Zytokine, die wiederum die Erweiterung der eigenen Gruppe fördert und die Differenzierung naiver Zellen in andere Gruppen unterdrückt. In Abbildung 1 wird der Zusammenhang der naiven CD4<sup>+</sup>-Zell-Differenzierung in die Subpopulationen der drei Effektor-Zellreihen und der Tregs nochmals veranschaulicht.



**Abbildung 1: Differenzierungswege naiver T-Helferzellen**

Dargestellt sind die 4 klassischen Subpopulationen der CD4<sup>+</sup>-Zellen, die sich aus der naiven CD4<sup>+</sup>-Zelle differenzieren können. Es sind die vorrangig von ihnen produzierten Zytokine abgebildet. Darunter finden sich die für die Differenzierung aktivierten und verstärkt exprimierten jeweiligen Transkriptionsfaktoren. Im Pfeilverlauf aufgezeigt sind die Voraussetzungen des Umgebungsmilieus (Zytokine) für die Entwicklung in die jeweilige Richtung.  
Eigene Abbildung.

### 1.1.2 Regulatorische T-Zellen (Tregs)

5-10 % der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen im Blutkreislauf sind Tregs [2]. Sie sind essenziell für die Begrenzung von Immunantworten und verhindern Autoimmunität. Erste Hinweise auf das Vorhandensein von suppressiv auf das Immunsystem einwirkenden Zellen wurden bereits 1970 von Gershon et al. beobachtet. 2001 wurden parallel in mehreren Arbeitsgruppen die humanen Tregs als CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen charakterisiert und 2003 die Rolle von FoxP3 für die Tregs erstmals beschrieben [13, 14].

Die genaue Definition der Tregs unterscheidet sich je nach Literatur, beispielsweise.  $CD4^+CD25^+$  oder  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ . Eine niedrige CD127-Expression ist charakteristisch für humane natürliche Tregs [13, 15].

#### 1.1.2.1 *Entwicklung der Tregs*

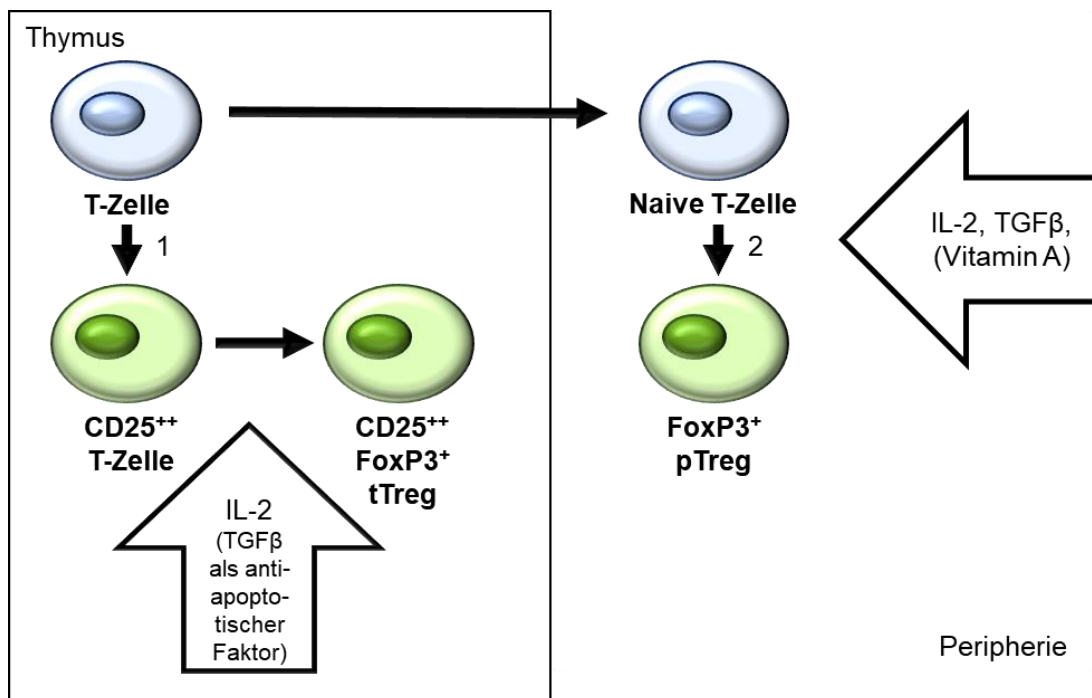
Tregs werden derzeit in zwei Gruppen unterteilt. Einerseits in eine Gruppe direkt aus dem Thymus hervorgehender natürlicher Tregs (nTregs oder tTregs) und andererseits in eine Gruppe von in der Peripherie aus naiven  $CD4^+$ -T-Zellen differenzierten induzierten Tregs (iTregs oder pTregs) [2].

nTregs aus dem Thymus sind T-Zellen mit stark-affiner Bindung des TCRs an Selbstantigene auf MHC-Molekülen. Das TCR-Signal führt zu einer vermehrten Expression des IL-2-Rezeptors CD25. In der 2-Schritt-Hypothese von Lio et al. dient dieser erste TCR-abhängige Schritt zur Bildung von  $CD25^{++}$ -T-Zellen im Thymus, welche dann eine erhöhte Sensitivität für IL-2 besitzen. Im zweiten Schritt führt der Einfluss von IL-2 und anderen Zytokinen wie IL-7 und IL-15 im Umgebungsmilieu zu einer STAT5-Aktivierung, welche letztlich in eine FoxP3-Induktion mündet [6, 15]. TGF $\beta$  wird nicht als essenziell für die FoxP3-Expression in nTregs angesehen, sondern vielmehr als wichtiges Überlebenssignal der Treg-Vorläuferzellen erachtet [6]. nTregs besitzen eine bestimmte hypomethylierte DNA-Sequenz CNS2, welche als entscheidend für die Generierung stabiler FoxP3-Expression und funktionierender Tregs erachtet wird. Während die Stärke des TCR-Signals einen Einfluss auf die FoxP3-Induktion besitzt, so ist die Länge dieses Signals verantwortlich für die Etablierung der Treg-spezifischen DNA-Hypomethylierungen [16]. In vitro induzierten Tregs mit vorübergehender FoxP3-Hochregulation hingegen fehlen zunächst diese epigenetischen Modifikationen, die zur stabilen FoxP3-Expression führen [17].

Die TCRs der iTregs hingegen sind nicht gegen Selbstantigene, sondern physiologischerweise gegen die kommensale Mikroflora und andere Umweltantigene gerichtet. Es wird angenommen, dass die Induktion von iTregs durch die Entwicklung aus anderen  $CD4^+$ -Zellen einen Einfluss auf das T-Zell-Gleichgewicht in der Peripherie besitzt [17]. Die kontinuierliche Stimulation des TCRs bei gleichzeitig geringer Costimulation über CD28 führt in Umgebung von

CTLA-4, IL-2 und TGF $\beta$  zu einer vermehrten FoxP3-Expression naiver T-Zellen. Bei bereits CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-T-Zellen genügt eine Stimulation über IL-2 ohne gleichzeitigen TGF $\beta$ -Einfluss, um FoxP3<sup>+</sup>Tregs zu generieren. Auch Retinsäure wirkt zusammen mit TGF $\beta$  im lymphatischen Darmgewebe auf die Induktion von FoxP3 und damit auf die iTreg-Generierung ein [6]. Ähnlich den nTregs ist auch bei iTregs durch TCR-Signale im Verlauf eine schrittweise Demethylierung der CNS2-Region zu finden, welche in eine stabilere FoxP3-Expression mündet. Unentbehrlich für die Entwicklung hier ist zusätzlich die CNS1-Region, welche sensitiv für TGF $\beta$  ist [18].

Eine vereinfachte Darstellung dieser Entwicklungsschritte ist in Abbildung 2 skizziert.



**Abbildung 2: Entwicklung der natürlichen und induzierten Tregs**

Für die Entwicklung der natürlichen tTreg im Thymus ist eine mittelstarke TCR-Stimulation durch ein Selbstantigen (1) nötig. TGF $\beta$  wirkt hier v.a. als Überlebenssignal in der T-Zell-Entwicklung und nicht explizit als FoxP3-induzierend. Für die Entwicklung der induzierten pTreg in der Peripherie hingegen erfolgt ein eher schwaches TCR-Signal durch die kommensale Mikroflora in Kombination mit einer CD28-Costimulation (2). Sowohl IL-2 als auch TGF $\beta$  sind für die FoxP3-Expression essenziell. Weiterhin wird Vitamin A (Retinsäure) im lymphatischen Gewebe des Darms als FoxP3-induzierender Cofaktor beschrieben. Eigene Abbildung.

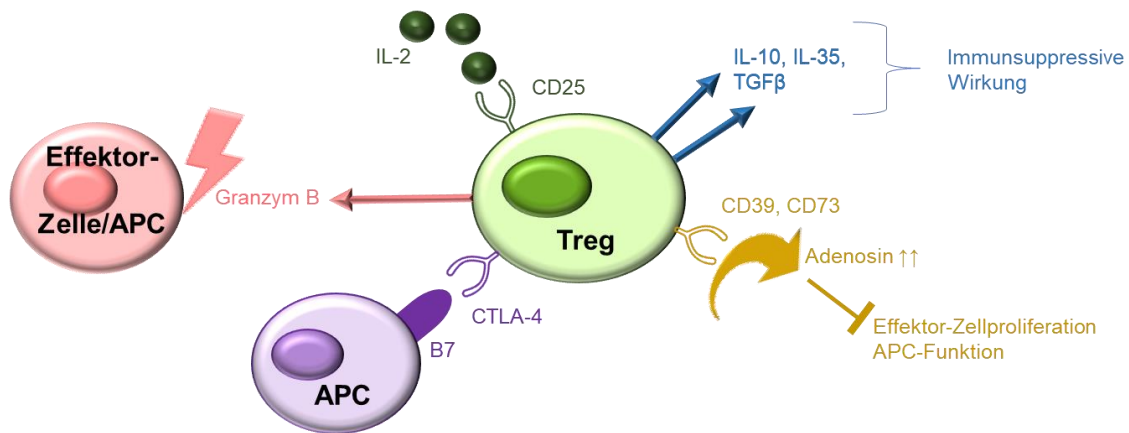
### 1.1.2.2 *Suppressionsfähigkeit der Tregs*

Bezüglich des Phänotyps und der Funktion unterscheiden sich die beiden Untergruppen von nTreg und iTreg nach bisherigen Erkenntnissen nur wenig. Gemein sind ihnen die CD4-Positivität und der Transkriptionsfaktor FoxP3.

Der ursprüngliche Treg-Marker CD25 ( $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptor) ist auf Tregs hoch exprimiert. Es wird angenommen, dass hierdurch Effektor-T-Zellen das proliferationsfördernde Zytokin IL-2 entzogen wird. Das ebenfalls in großen Mengen auf Tregs zu findende Oberflächenmolekül CTLA-4 konkurriert mit den Effektor-Zellen um Bindung der B7-Moleküle der APCs und verhindert so die costimulatorischen Signale, die für die Zellaktivierung nötig sind. Ein weiterer Mechanismus der Suppression von Effektor-Zellen durch Tregs erfolgt über die Oberflächenmoleküle CD39 und CD73; diese schränken über eine Erhöhung der Adenosinspiegel die Proliferation der Effektor-T-Zellen ein und setzen außerdem die Funktion der APCs herab. Die Interaktion von dendritischen Zellen mit Tregs bewirkt weiterhin eine Produktion von immunsuppressiven Zytokinen wie IL-10 und TGF $\beta$  durch die dendritischen Zellen [6, 18].

Die von Tregs produzierten Zytokine IL-10, IL-35 und TGF $\beta$  wirken selbst immunsuppressiv und unterdrücken Antworten der Effektor-T-Zellen. Außerdem zeigen Tregs in vitro über von ihnen sezerniertes Granzym B die Fähigkeit Effektor-Zellen oder APCs zu töten [6]. IL-10 inhibiert die IL-12-Produktion in dendritischen Zellen und Makrophagen, was wiederum die IFN $\gamma$ -Produktion herabsetzt. Außerdem inhibiert es die Expression von Costimulatoren und MHC-II-Molekülen auf den genannten Zellgruppen, was eine verringerte T-Zell-Aktivierung zur Folge hat [3]. IL-10 wirkt vor allem suppressiv auf Th17-Zellen und die Migration von Th1-Zellen zu entzündeten Darmgebieten sowie durch die Aufrechterhaltung der FoxP3-Expression [19]. TGF $\beta$  wirkt inhibierend auf T-Zell-Proliferation und -Funktion und unterdrückt auch die Funktion von Neutrophilen und Endothelzellen. Je nach Umgebungsmilieu fördert es die Entwicklung von Th17-Zellen oder Tregs. Eine weitere Funktion von TGF $\beta$  ist die Förderung der Gewebereparatur nach lokaler Entzündungsreaktion [3]. IL-35 hat einen verstärkenden Einfluss auf die Suppressionsfähigkeit von Tregs [20].

Einen Überblick über die wichtigsten Aspekte der Suppressionsfähigkeit von Tregs gibt Abbildung 3.



**Abbildung 3: Darstellung der immunsuppressiven Wirkung einer regulatorischer T-Zelle**

Das Schaubild zeigt die wichtigsten immunsuppressiven Funktionen von Tregs. Über CD25 wird IL-2 abgefangen, welches dann keine proliferationsfördernde Wirkung auf Effektorzellen haben kann. Durch Sekretion von Granzym B können andere Zellen abgetötet werden. CTLA-4 konkurriert mit Effektor-Zellen um die B7-Bindung der APCs. Eine Aktivierung der Effektorzelle über die B7-CD28-Costimulation wird somit unterbunden. Erhöhte Adenosinspiegel durch CD39 und CD73 hemmen die Effektor-Zell-Proliferation sowie die APC-Funktion. Die durch die Treg produzierten Zytokine IL-10, IL-35 und TGFβ haben selbst zahlreiche immunsuppressive Effekte.

Eigene Abbildung.

Transkriptionsfaktoren anderer Zelllinien der T-Helferzellreihe, wie T-bet, STAT3 oder IRF-4 (Interferon regulatory factor), die auch in Tregs exprimiert werden, scheinen ebenfalls einen wichtigen Anteil an der Immunsystem-Homöostase und Treg-Funktion zu besitzen [2, 6]. So ist T-bet in einer Subpopulation von Tregs vermutlich nötig, um Th1-vermittelte Entzündungsreaktionen zu kontrollieren, wohingegen T-bet-lose Tregs IFNγ-produzierende Th1-Zellen nicht erfolgreich eindämmen können. Analoge Berichte gibt es bzgl. STAT3 für IL-17- und Th17-vermittelte Inflammationen und bzgl. IRF-4 für IL-4-produzierende Th2-dominante Inflammationen. Eine ungenügende Kontrolle der jeweiligen Entzündungsprozesse durch die Tregs beruht vermutlich einerseits auf einer mangelnden Chemokinrezeptorexpression auf Tregs (CXCR3 für Th1, CCR6 für Th17 und CCR8 für Th2) und der damit verbundenen beeinträchtigten Treg-Migrationsfähigkeit; andererseits auf einer geringeren IL-10-Produktion und Proliferationsfähigkeit im Entzündungsgebiet, hervorgerufen durch fehlende Transkriptionsfaktoren [18]. Diese Beobachtungen legen eine Spezialisierung

verschiedener Treg-Subpopulationen auf die Kontrolle spezifischer T-Helferzelllinien nahe.

### 1.1.2.3 *FoxP3-Expression auf Tregs*

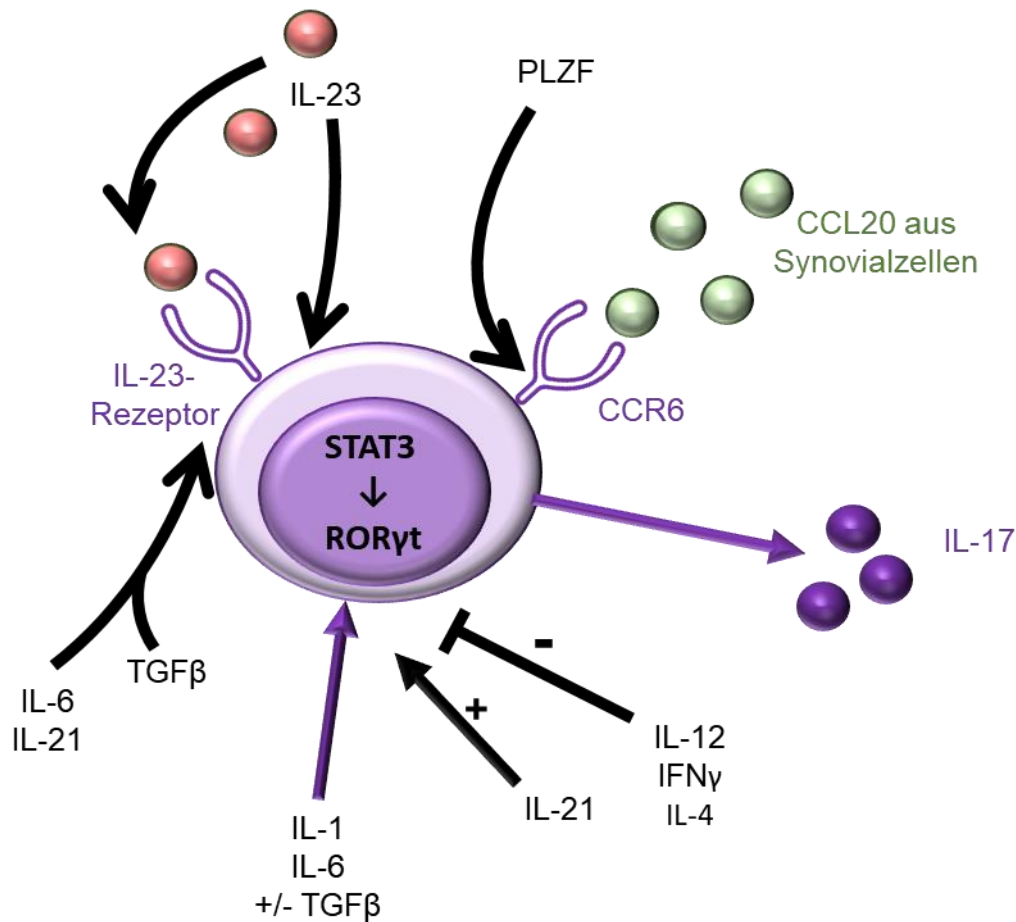
Der Stellenwert der FoxP3<sup>+</sup>-Tregs in der immunologischen Toleranz wird ersichtlich beim sog. IPEX-Syndrom (X-Chromosomale Polyendokrinopathie Enteropathie), welches auf einer Mutation des FoxP3-Genes auf dem X-Chromosom beruht und bei Betroffenen ein i.d.R. innerhalb der ersten 2 Lebensjahre tödlich verlaufendes Polyautoimmunsyndrom mit lymphoproliferativen Erkrankungen, Thyreoiditis, Psoriasis, Dermatitis, Diabetes, Enteropathien mit Diarrhöen etc. hervorruft [4, 6]. FoxP3 selbst ist nicht nur in Lymphozyten, sondern auch in Epithelzellen exprimiert, wo es als Tumorsuppressor wirkt. Ein Zusammenhang mit FoxP3-Dysfunktion und Tumoren wie Brustkrebs wird diskutiert [21]. FoxP3 ist essenziell für die Entwicklung der natürlichen Tregs im Thymus sowie für das Überleben und die Aufrechterhaltung der Funktionalität der Tregs in der Peripherie. Außerdem hemmt FoxP3 die Differenzierung der Zelle in andere Richtungen. Der Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t beispielsweise, der eine Entwicklung Richtung Th17-Zelle fördert und auch in vielen Tregs zumindest gering vorhanden ist, kann von FoxP3 außer Kraft gesetzt werden [6, 22]. Eigenschaften wie die niedrige IL-7-Rezeptordichte (CD127<sup>dim/-</sup>), die hohe IL-2-Rezeptordichte (CD25<sup>+</sup>), die fehlende IL-2-Produktion und damit das Angewiesensein der Tregs auf exogenes IL-2 sind vermutlich nicht direkt von FoxP3 abhängig. Hingegen scheint die Verstärkung der CD25-Expression, die CTLA-4- und GITR-Expression (ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie, das wichtige Überlebenssignale an die Zelle sendet), die Proliferationsfähigkeit und die Suppressionsfähigkeit der Tregs FoxP3-abhängig zu sein. FoxP3-Verlust in Tregs führte in Versuchen zum Verlust der Suppressionsfunktion, zu erhöhter IL-2-Produktion und zur Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie IL-17, IFN $\gamma$  oder IL-4 [22]. Auch die Menge an FoxP3 ist relevant für die Suppressionsfunktion. Eine reduzierte FoxP3-Menge führte in Experimenten zu verminderter Suppressionsfähigkeit. Hohe FoxP3-Level in CD25<sup>+</sup>-T-Zellen führten hingegen zu suppressiver Funktion der

Zellen. Instabile FoxP3-Expression in Tregs wiederum, beispielsweise unter IL-6 oder TNF $\alpha$ -Einfluss, führte zu erhöhter inflammatorischer Zytokinproduktion, was ein wesentlicher Punkt der Treg-Plastizität sein könnte [6]. Zusammenfassend sind nicht alle FoxP3<sup>+</sup>-Zellen funktionierende Tregs und für nicht alle phänotypischen Merkmale der Tregs ist FoxP3 essenziell. Die Suppressionsfunktion der Zellen jedoch ist anscheinend eng mit FoxP3 verbunden [16].

### **1.1.3 Th17-Zellen**

Th17-Zellen als Untergruppe der CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen machen rund 1 % der zirkulierenden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus [23] und wurden 2005 erstmals beschrieben. Sie sind definiert durch die Zytokinproduktion von IL-17A, IL-17F, IL-21 und IL-22 sowie des GM-CSF (granulocytes macrophage colony-stimulation factor). Th17-Zellen sind wichtig für die Abwehr von extrazellulären Erregern. Der Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t wird über STAT3 bei Anwesenheit von IL-1 und IL-6 induziert und induziert selbst wiederum direkt die IL-17-Produktion. ROR $\gamma$ t wird aber als weniger stabil und mehr durch Umgebungsbedingungen beeinflussbar angesehen als beispielsweise T-bet oder GATA3. IL-21 wirkt fördernd auf die Differenzierung der Th17-Zellen, wohingegen IL-12, IFN $\gamma$  oder IL-4 und damit starke Th1- oder Th2-Antworten die Th17-Entwicklung hemmen. In Anwesenheit von IL-6 oder IL-1 wirkt das eigentlich antiinflammatorische Zytokin TGF $\beta$  zusätzlich auf die Entwicklung des proinflammatorischen Th17-Phänotyps ein. Die Kombination von TGF $\beta$  und IL-6/IL-21 bewirkt eine Expression des IL-23-Rezeptors, der über STAT3 den Th17-Phänotyp weiter stabilisiert und zu einer pathogenen Entwicklung beiträgt. Der Transkriptionsfaktor PLZF (Promyelocytic leukemia zinc finger-Protein) ist ebenfalls wichtig für die Aufrechterhaltung des Th17-Phänotyps und die Expression von CCR6, einem Rezeptor, der die Bindung von CCL20 ermöglicht [3, 24, 25] (vgl. Abbildung 4).





**Abbildung 4: Einflussfaktoren auf die Th17-Differenzierung**

Dargestellt sind die Einflussfaktoren auf die Th17-Differenzierung: Die Zytokine IL-1, IL-6 und TGFβ fördern eine Induktion von STAT3 und RORγt. RORγt führt zur IL-17-Produktion. IL-6, IL-21 und TGFβ führen weiterhin zu einer vermehrten Expression des IL-23-Rezeptors, der durch Aktivierung durch IL-23 eine weitere Stabilisierung von STAT3 bewirkt. Außerdem wirkt IL-21 fördernd auf die Differenzierung von Th17, IL-12, IFNγ und IL-4 hemmend auf die Th17-Differenzierung. PLZF (Promyelocytic leukemia zinc finger) induziert die CCR6-Expression. Eigene Abbildung.

IL-17 induziert eine neutrophilenreiche Entzündungsreaktion über eine Produktion von Chemokinen und TNFα und stimuliert die Produktion antimikrobieller Substanzen wie Defensine. IL-22 wirkt in Gegenwart von IL-17 proinflammatorisch und in Abwesenheit von IL-17 protektiv auf Atemwege. Eine besondere Rolle kommt den beiden Zytokinen beispielsweise bei der Pathogenese der Psoriasis zu [3, 24].

Während früher Th1-Zellen eine wesentliche Rolle an der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen zugesprochen wurde, werden heute Th17-Zellen in den Mittelpunkt gestellt. IL-17-Anreicherungen wurde in Läsionen von Multiple

Sklerose, Psoriasis, chronisch entzündlichen Darmerkrankung und rheumatoider Arthritis detektiert. Epigenetische Veränderungen und Polymorphismen in Th17-Enhancern wurden in einer Studie festgestellt [24, 26].

Eine weitere Unterteilung der CCR6<sup>+</sup>Th17-Zellen ist möglich: klassische CCR4<sup>+</sup>CXCR3<sup>-</sup>Th17-Zellen produzieren viel IL-17A; nicht-klassische, sog. CCR4<sup>-</sup>CXCR3<sup>+</sup>-Th17/Th1-Zellen, produzieren dagegen wenig IL-17A und viel IFN $\gamma$  und exprimieren gleichzeitig T-bet. Letztere Zellpopulation wird in Autoimmunerkrankungen wie RA, Multiple Sklerose oder JIA pathogener als normale Th17-Zellen angesehen [10, 24, 27].

#### **1.1.4 Plastizität von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen**

Naive CD4<sup>+</sup>-T-Zellen können sich je nach TCR-Stimulation und Zytokinmilieu in unterschiedliche Subpopulationen differenzieren. Dabei spielen sowohl Transkriptionsfaktoren als auch epigenetische Veränderungen eine Rolle. Die Differenzierung ist laut neuesten Erkenntnissen jedoch nicht so terminal wie bisher angenommen. T-Lymphozyten besitzen eine gewisse Flexibilität was ihren Phänotyp und ihre Funktion betrifft und sind je nach Umgebungsmilieu zum Teil in der Lage diese zu ändern. Es wird angenommen, dass Th1 und Th2-Zellen relativ stabil sind, da sich ihre Transkriptionsfaktoren und Zytokine selbst fördern und die Differenzierung in andere Populationen hemmen. Allerdings liegen selbst hier Th1/Th2-Hybridformen mit gleichzeitiger IFN $\gamma$ /IL-4-Produktion vor [24, 28].

Die Plastizität der Lymphozyten ermöglicht eine adaptierte Antwort des Immunsystems auf Anforderungen bei Infektionen. Besonders die Plastizität der Th17 und Treg-Zellen zeigte sich jedoch nicht nur förderlich für das Immunsystem. Bei vielen Autoimmunerkrankungen wird ein Zusammenhang mit fehleregelter CD4<sup>+</sup>-Plastizität vermutet.

##### *1.1.4.1 Th17-Plastizität*

Th17-Zellen benötigen für ihre Stabilisierung TGF $\beta$ , verlieren diese jedoch unter IL-12-Einfluss. Sie wandeln sich in einen Th1-ähnlichen Phänotyp mit T-bet und STAT4-Expression, sowie IFN $\gamma$ -Expression um. Diese stark pro-

inflammatorischen Th17/Th1-Zellen exprimieren CD161, weiterhin geringere Mengen ROR $\gamma$ t und IL-17, jedoch nun auch TBX21 und CXCR3. IL-23 scheint ebenfalls eine Rolle zu spielen [24, 29]. Auch eine Umwandlung des Th17-Phänotyps hin zu Th2-Zellen scheint vorhanden. Vermutlich unter Einfluss von IL-4 entwickelt sich ein Th17/Th2-Zelltyp mit z.T. IL-10 oder IL-4 sezernierenden anti-inflammatorisch wirkenden Zellen [29].

#### 1.1.4.2 *Treg-Plastizität*

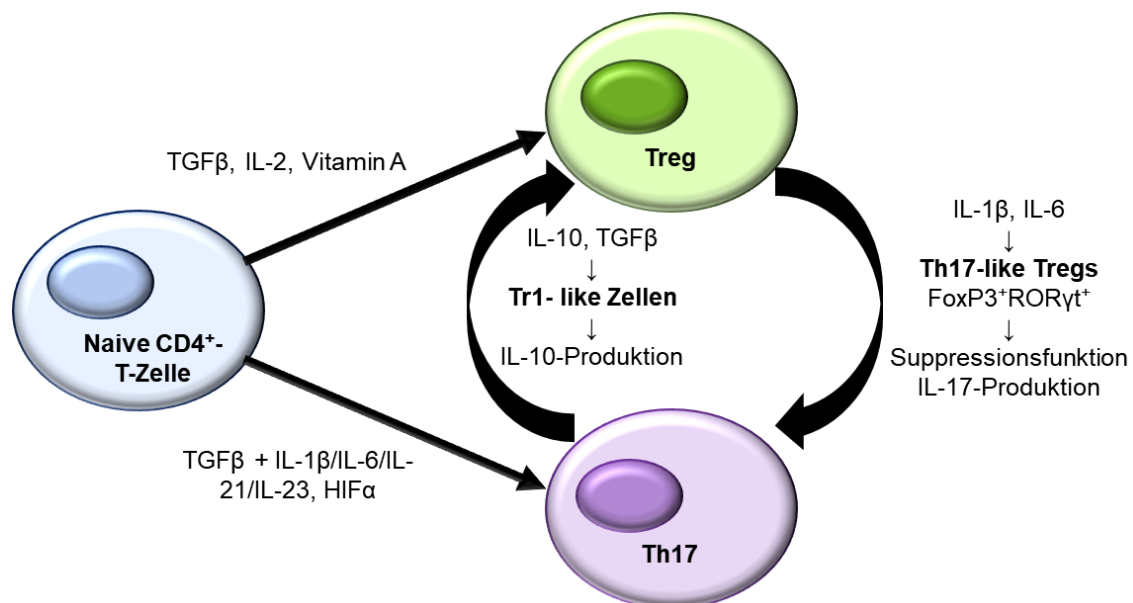
Ebenso besitzen Tregs eine gewisse Plastizität. Es wird angenommen, dass nTregs in der Regel sehr stabil sind, zumindest um einiges stabiler als iTregs [30]. Unter bestimmten Bedingungen verlieren jedoch auch sie ihre FoxP3-Expression und werden instabil. FoxP3 supprimiert an sich bereits die zu starke Expression der Transkriptionsfaktoren anderer Zellreihen (wie beispielsweise T-bet), wobei diese dennoch zu einem gewissen Grad in den Tregs co-exprimiert sind (vgl. Kapitel 1.1.2.2). Wird FoxP3 oder der Methylierungsstatus der Treg instabil (z.B. unter inflammatorischen Bedingungen), so kann dies eine Plastizität der Treg hin zu einer proinflammatorischen Zelllinie zur Folge haben [6]. Neben des Methylierungsstatus scheint auch die Ubiquitinierung als posttranslationale Modifikation einen Einfluss auf die Stabilität von FoxP3 zu besitzen und die Plastizität der Tregs zu beeinflussen [31]. Die Plastizität der Tregs bezieht sich jedoch nicht nur auf die FoxP3-Expression, sondern auch auf deren weiteren Phänotyp und Funktionszustand [32]. Demnach sind nicht nur FoxP3-Tregs in der Lage proinflammatorische Zytokine zu produzieren, sondern auch FoxP3<sup>+</sup>-Tregs. Neben der Plastizität zwischen Tregs und Th17-Zellen, die im nächsten Unterkapitel (vgl. Kapitel 1.1.4.3) beschrieben wird, wurde vor allem ein sogenannter Th1-like Treg-Typ beobachtet. Eine Umwandlung von Tregs zum proinflammatorischen Phänotyp, der durch IFN $\gamma$ -Produktion charakterisiert ist und mit einem Verlust der Suppressionsfunktion einhergeht [18], kann in einem inflammatorischen Milieu unter IL-2- und IL-12-Einfluss erfolgen. Hierbei wird auch eine vermehrte T-bet- und CXCR3-Expression auf den Tregs beobachtet [29]. Zu bemerken ist jedoch, dass Effektor-Zellen bei Aktivierung temporär FoxP3 hochregulieren. D.h. eine Unterscheidung von leicht FoxP3<sup>+</sup>-T-Effektor-

Zellen und FoxP3<sup>+</sup>-proinflammatorischen Tregs ist unter Umständen schwierig [30].

#### 1.1.4.3 *Treg-Th17-Plastizität*

Die enge Verbundenheit dieser beiden Zellpopulationen lässt sich bereits in der Entstehung aus naiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erahnen. TGFβ spielt sowohl für die Th17 als auch die Treg-Entwicklung eine essenzielle Rolle (vgl. Abbildung 5). Eine durch IL-10 und TGFβ stimulierte IL-10-produzierende Th17-Subpopulation (sog. Tr1-like Zellen = T-regulatory-Type-1 Zellen) wurde ebenso beschrieben [24] wie Th17-like Tregs. Die Entwicklung der letztgenannten Population aus Tregs geschieht in inflammatorischem Milieu unter IL-1β- und IL-6-Einfluss und daraus folgender Hochregulation von STAT3, RORγt und RUNX. Diese Tregs hatten ursprünglich bereits eine RORγt- und CCR6-Expression [29]. Weiterhin konnten auch epigenetische Veränderungen an diesen Zellen beobachtet werden [30]. Die Suppressionsfähigkeit der Tregs mit Th17-Phänotyp wird kontrovers betrachtet. Wie von Campbell et al. zusammengefasst, verlieren stimulierte Tregs in Anwesenheit von IL-6 ihre FoxP3-Expression und ihre Inhibitionsfähigkeit gegenüber anderen T-Zellen, bei gleichzeitiger Entwicklung hin zu Th17-Zellen. Außerdem bewirkt IL-6 eine erhöhte Resistenz der Effektor-T-Zellen gegenüber der Treg-Suppression [18]. Kleinewietfeld et al. hingegen postulierten aufgrund der Studie von Beriou eine zunächst erhaltene Suppressionsfunktion der Th17-like Tregs, die jedoch bei einer Aktivierung unter IL-1β und IL-6-Bedingungen schnell verloren geht [29]. Andererseits stellten Hagenstein et al. fest, dass eine IL-6-Rezeptor-Stimulation die Entwicklung von hoch-suppressiven RORγt<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>-Tregs förderte, das Ausschalten des Rezeptor-Weges in Knockout-Mäusen jedoch eine verminderte Suppressionsfunktion der Tregs verursachte [33]. Beriou et al. zeigten, dass IL-17 exprimierende FoxP3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> Tregs per se noch suppressionfähig sind, allerdings bei Stimulation mit IL-1β- und IL-6 die Sekretion von IL-17 beginnen und während dieser Sekretionsphase ihre Suppressionsfähigkeit verlieren. Dieser Zustand ist jedoch reversibel mit der Beendigung der IL-17-Sekretion [34]. Ebenfalls ist noch umstritten, ob es sich bei den Th17-like Tregs mit RORγt und Foxp3-Coexpression um frühe Formen in der

Differenzierung der Th17- und Treg-Zelllinie handelt es sich um plastische Tregs, die unter IL-6-Einfluss mit folgender STAT3-Aktivierung ihre FoxP3-abhängigen antagonistischen Eigenschaften verlieren [30]. Interessanterweise verlieren Tbet<sup>+</sup>GATA3<sup>+</sup>-Tregs ihre Suppressionsfähigkeit bei gleichzeitiger Hochregulation von ROR $\gamma$ t und IL-17-Produktion, sowie Niederregulation von FoxP3 [30]. Zusammenfassend herrscht eine sensible Balance zwischen Tregs und Effektor-T-Zellen, v.a. Th17-Zellen, und deren Transkriptionsfaktoren, die je nach Umgebungsmilieu einen mehr oder minder starken Einfluss auf den Treg-Phänotyp und ihre Funktion haben können, wobei effector-like (Effektor-ähnliche, z.B. Th1-like Tregs oder Th17-like Tregs) Tregs mit zumindest temporärem FoxP3-Verlust i.d.R. einen Funktionsverlust erfahren und eine unkontrolliertere Immunantwort abläuft. Gleichzeitig scheinen diese effector-like Treg-Linien eine spezifische Suppressions- und Regulationsfunktion in Bezug auf die jeweiligen Zelllinien zu haben. Sie sind daher nicht per se pathologisch, können jedoch je nach Milieu und Persistenz pathologisch werden [30].



**Abbildung 5: Entwicklung und Plastizität der Treg und Th17-Zellen**

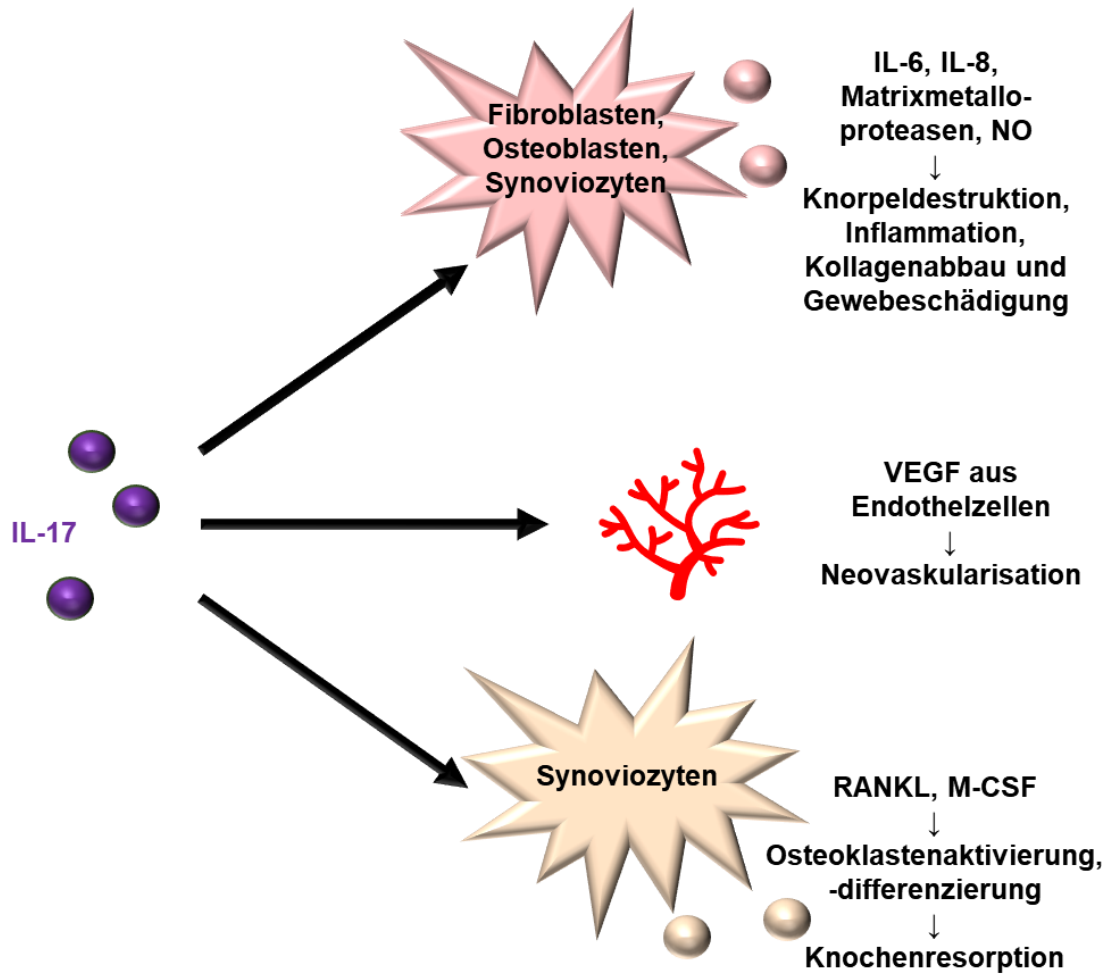
Während TGFβ in der Entwicklung der Treg und Th17-Zelle aus der naiven CD4<sup>+</sup>-Zelle eine zentrale Rolle spielt und hierbei das weitere Umgebungsmilieu die Differenzierung entscheidet, ist auch eine Plastizität der beiden Zellgruppen je nach Zytokinmilieu zu beobachten. Th17-like Tregs besitzen eine zunächst erhaltene Suppressionsfunktion und sind in der Lage bei Aktivierung in proinflammatorischem Milieu IL-17 zu produzieren. Die in antiinflammatorischem Milieu entstehenden Tr1-like Th17-Zellen sind in der Lage IL-10 zu produzieren.  
Erstellt nach [24, 29]

## 1.2 IL-17

IL-17 ist ein stark proinflammatorisches Zytokin. Es induziert andere proinflammatorische Zytokine wie IL-6 und TNF, G-CSF zur Granulozytenstimulation, M-CSF zur Makrophagenstimulation, Chemokine (CCL2, MIP-2) und Matrixmetalloproteasen, was zur Gewebe-Infiltration durch Entzündungszellen und letztlich zu Gewebedestruktion führt. Weiterhin induziert es die Aktivierung und Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten [25]. Die vorrangige Quelle für IL-17 sind Th17-Zellen, jedoch wird es auch von NKTs, Neutrophilen, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen oder  $\gamma\delta$ -Zellen produziert. IL-17 ist nicht nur ein Zytokin, sondern eine Zytokinfamilie bestehend aus 6 Mitgliedern (IL-17A-F). Die zugehörigen Rezeptoren sind ubiquitär auf Zellen des menschlichen Körpers zu finden (z.B. Fibroblasten, Endothelzellen, Immunzellen) und wirken über NF- $\kappa$ B und andere Signalwege inflammatorisch auf die Zellen ein [35].

### 1.2.1 IL-17 in Autoimmunerkrankungen

Es wird angenommen, dass IL-17 eine zentrale Rolle bei diversen Autoimmunerkrankungen, wie Asthma, Multiple Sklerose, Systemischer Lupus Erythematoses und auch Rheumatoide Arthritis spielt [25]. Bei der Arthritis wirkt IL-17 direkt auf die Gelenkentzündung ein und fördert die Synovitis, die Knorpel- und Knochenschädigung sowie die Pannus-Formierung [35], dargestellt in Abbildung 6. IL-17 wirkt synergistisch mit dem proinflammatorischen TNF, welches in der Synovialflüssigkeit betroffener Personen ebenfalls vermehrt vorkommt [36].



**Abbildung 6: Effekt von IL-17 auf den Arthritis-Mechanismus**

Darstellung der verschiedenen Wirkmechanismen des IL-17 auf ein arthritisches Gelenk, welche insgesamt destruktiv auf das Gelenk einwirken.  
 NO = Stickstoffmonoxid; VEGF = vascular endothelial growth factor; RANKL = Receptor activator of NF- $\kappa$ B-Ligand; M-CSF = Macrophage colony stimulating factor  
 Eigene Abbildung.

IL-17-Konzentrationen in der Synovia arthritischer Gelenke sind prädiktiv bezüglich der künftigen Gelenkzerstörung, die Höhe der IL-17-Spiegel in Blut und Synovialflüssigkeit korrelieren mit der Krankheitsaktivität rheumatoider Arthritis-Patienten [36].

### 1.3 Juvenile Idiopathische Arthritis (JIA)

Die chronische Arthritis im Kindesalter ist eine im Vergleich zur Erwachsenenarthritis zwar seltenere Erkrankung, jedoch selbst mit einer Inzidenz von 6/100000/Jahr [37] bis 35/100000/Jahr in Deutschland [38] keine

Rarität. Der von der ILAR (International League of Associations for Rheumatology) eingeführte Begriff der juvenilen idiopathischen Arthritis sammelt die ehemaligen Begriffe der juvenilen rheumatischen Arthritis, geprägt durch das ACR (American College of Rheumatology), und der juvenilen chronischen Arthritis, geprägt durch die EULAR (European League Against Rheumatology). Er ist ein Überbegriff für sieben unterschiedliche Formen. Gemeinsam ist sämtlichen Kategorien, dass Kinder von unter 16 Jahren für mindestens sechs Wochen von einer Arthritis eines oder mehrerer Gelenke unklarer Ätiologie betroffen sind.

### **1.3.1 Klassifikation und Klinik**

Die momentan verwendete ILAR-Klassifikation aus dem Jahr 2001 [39] unterscheidet sieben Subgruppen der JIA und kann frühestens sechs Monate nach Beginn der Erkrankung zugeordnet werden. Eine Überarbeitung der Kriterien ist aktuell durch Martini et. Al angestrebt [40]. Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die Subkategorien, die mit ihren Definitionen und Einschlusskriterien auch in dieser Arbeit Anwendung finden.



**Tabelle 3: Kategorien der JIA laut ILAR-Klassifikation (Second Revision aus dem Jahr 2001)**

JIA-Unterform	Definition	Ausschlusskriterien	Häufigkeit [38]
<b>Systemische Arthritis (sJIA)</b>	Arthritis mit gleichzeitigem oder vorhergehendem Fieber von mind. 2 Wochen (davon mind. 3 Tage durchgängig erfasst) und mind. eines der folgenden Kriterien: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Flüchtiger erythematöser Ausschlag</li> <li>• Generalisierte Lymphknotenschwellung</li> <li>• Hepato- und/oder Splenomegalie</li> <li>• Serositis</li> </ul>	a, b, c, d	4-17 %
<b>Oligoarthritis</b>	1-4 Gelenke in den ersten 6 Erkrankungsmonaten betroffen <ul style="list-style-type: none"> <li>• Persistierende Oligoarthritis (pOA): 1-4 betroffene Gelenke im Krankheitsverlauf</li> <li>• Extended (=erweiterte) Oligoarthritis (eOA): über 4 betroffene Gelenke nach den ersten 6 Erkrankungsmonaten</li> </ul>	a, b, c, d, e	27-56 %
<b>RF (Rheumafaktor)-negative Polyarthritis</b>	5 oder mehr Gelenke in den ersten 6 Erkrankungsmonaten betroffen, bei gleichzeitig negativem Test auf RF	a, b, c, d, e	11-28 %
<b>RF-positive Polyarthritis</b>	5 oder mehr Gelenke in den ersten 6 Erkrankungsmonaten betroffen, bei gleichzeitig mind. 2-mal positivem Test (im Abstand von mind. 3 Monaten) auf RF	a, b, c, e	2-7 %
<b>Psoriasis-Arthritis (PsA)</b>	Arthritis und Psoriasis oder Arthritis und mind. 2 der folgenden Kriterien: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Daktylitis</li> <li>• Nageltüpfelung oder Onycholyse</li> <li>• Psoriasis bei erstgradig verwandter Person</li> </ul>	b, c, d, e	2-11 %
<b>Enthesitis-assoziierte Arthritis (EAA)</b>	Arthritis und Enthesitis oder Arthritis oder Enthesitis mit mind. 2 der folgenden Kriterien: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aktueller oder vergangener Druckschmerz in den Sakroiliakalgelenken oder entzündlicher lumbosakraler Schmerz</li> <li>• HLA-B27-Antigen positiv</li> <li>• Auftreten der Arthritis bei einem Jungen älter als 6 Jahre</li> <li>• Akute (symptomatische) Uveitis anterior</li> <li>• Ankylosierende Spondylitis, Enthesitis-assoziierte Arthritis, Sakroiliitis bei chronisch entzündlicher Darmerkrankung, M. Reiter oder akute Uveitis anterior in der Anamnese einer erstgradig verwandten Person</li> </ul>	a, d, e	3-11 %
<b>Undifferenzierte Arthritis</b>	Arthritis, die die Kriterien keiner oder mehr als einer JIA-Unterform erfüllt		11-21 %
<b>Ausschlusskriterien:</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>a: Psoriasis oder positive Psoriasis-Anamnese beim Patienten oder bei erstgradig verwandter Person</b></li> <li>• <b>b: Arthritis bei HLA-B27 positivem männlichen Patient nach dem 6. Geburtstag</b></li> </ul>			

- **c: Ankylosierende Spondylitis, Enthesitis-assoziierte Arthritis, Sakroiliitis bei chronisch entzündlicher Darmerkrankung, M. Reiter oder akute Uveitis anterior oder positive Anamnese für diese Erkrankungen in einer erstgradig verwandten Person**
- **d: Nachweis von IgM-Rheumafaktor bei mind. 2 Tests im Abstand von mind. 3 Monaten**
- **e: Nachweis einer sJIA**

Erstellt nach [39, 41]

Während die Oligoarthritis gehäuft in der frühen Kindheit (v.a. 2-4 Jahre) bei Mädchen auftritt, ist die EAA vor allem bei Jungen in der späten Kindheit oder in der Jugend zu finden. Die RF-positive Polyarthritis ist im Erkrankungsbeginn ebenfalls in der späten Kindheit und im Jugendalter zu verorten. Mädchen sind bei fast allen Formen der JIA häufiger betroffen, Ausnahmen bilden die eben erwähnte EAA sowie die sJIA, die Mädchen und Jungen gleich oft betrifft und keinen Altersgipfel zeigt [41].

### **1.3.2 Ätiologie**

Die Ätiologie der JIA ist noch weitgehend unklar. Wichtig ist laut aktuellen Erkenntnissen zwischen dem Subtyp der sJIA und den anderen Untergruppen der JIA zu unterscheiden. Bei der systemischen Verlaufsform wird nämlich davon ausgegangen, dass hier ein polygenes autoinflammatorisches Syndrom vorliegt, bei dem eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems eine wichtige Rolle spielt [42]. Weiterhin besteht eine starke Assoziation zum Makrophagenaktivierungssyndrom und zu den Zytokinen IL-1, IL-6 und IL-18 [43]. Das adulte Korrelat, der Adult-Onset Morbus Still (AODS) ist eine von der Rheumatoiden Arthritis gänzlich abgegrenzte Autoinflammationserkrankung mit entsprechend anderem Therapieansatz [44].

JIA-Patienten besitzen nach heutigem Kenntnisstand eine genetische Suszeptibilität, es liegt eine Konkordanzrate von 25-40% bei monozygoten Zwillingen vor [45]. Weiterhin hatten Geschwister betroffener Kinder ein erhöhtes relatives Risiko von 15-30 verglichen mit der Gesamtbevölkerung ebenfalls zu erkranken [46]. Jedoch zeigt die Erkrankung eine komplexe genetische Grundlage, da sie nicht nach Mendelschen Regeln vererbt wird, sondern auf einer Vielzahl an genetischen Variationen basiert. Bisher wurden viele assoziierte

Gene erforscht, die teils den HLA-Molekülen zugeordnet werden können (z.B. HLA-A2, HLA-B27, HLA-DRB1-Subtypen), teils den nicht-HLA-Molekülen angehören (z.B. PTPN22, MIF, SLC11A6, WISP3, TNFA). Einige dieser Gene sind prädisponierend für gewisse Subtypen der JIA (z.B. HLA-B27 für EAA), während andere ebenfalls mit weiteren Autoimmunerkrankungen assoziiert sein können (z.B. PTPN22 mit dem systemischen Lupus Erythematodes) [45].

Die EAA-Form zeigt eine hohe genetische Grundlage mit einem starken HLA-B27-Bezug (schwankende Prozentangaben des Vorkommens von HLA-B27 in EAA-Kindern von ca. 65-80 %). Die vermehrte Expression von TLR-2 und TLR-4 weist außerdem auf einen wesentlichen Anteil des angeborenen Immunsystems in der Pathogenese hin. Weiterhin besteht eine Assoziation mit dem ERAP-1-Molekül [47]. Ähnlich zu den Erwachsenen-Spondyloarthritis besteht auch hier der Verdacht auf eine entscheidende Rolle des Gastrointestinaltraktes. Infektionen dort werden als Auslöser einer Kreuzreaktion mit molekularem Mimikry diskutiert [48].

Die oben erwähnte Konkordanzrate von 25-40% lässt eine rein genetische Ätiologie der JIA unwahrscheinlich werden. Die multifaktorielle Genese weist also auf externe mögliche Risikofaktoren, wie beispielsweise Infektionen oder maternales Rauchen, sowie protektive Faktoren wie Stillen oder Vitamin D hin, die in diversen Studien untersucht und kontrovers diskutiert wurden. Die Kausalität dieser Umwelteinflüsse konnte bislang nicht ausreichend geklärt werden [49, 50].

### **1.3.3 Pathophysiologie**

In der Pathophysiologie der JIA gibt es einige Überschneidungspunkte mit der erwachsenen Rheumatoiden Arthritis. Histopathologisch findet in arthritischen Gelenken eine Entzündung der Synovia mit Hypertrophie und erhöhter Vaskularisation des Gewebes statt. Die Entzündung führt letztlich zu Pannusbildung sowie Knorpel- und Knochenerosionen durch aggressive Enzyme, wie den Metalloproteasen. Auf zellulärer Ebene erfolgt eine Infiltration der Synovia mit mononukleären-Zellen, wie T- und B-Lymphozyten, Makrophagen und

dendritischen Zellen [41]. Verschiedenen T-Zelllinien wird eine besondere Bedeutung in der Pathogenese der JIA zugeschrieben. Insbesondere die oligo- und polyartikulären Verlaufsformen scheinen eine starke Assoziation zu MHC II-Allelen zu besitzen [51]. CCR5<sup>+</sup> und CXCR3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Th1-Zellen wurden ebenso verstärkt in entzündeten Gelenken von JIA-Kindern gefunden [52] wie aktivierte Memory-T-Zellen. Eine zentrale Rolle in jüngeren Diskussionen zur Pathophysiologie der JIA nahmen Th17 und Tregs ein. Beide Zellpopulationen waren im Blut von Patienten erhöht [53], Nistala et al. zeigten eine Erhöhung der Anzahl an Th17-Zellen bei gleichzeitiger Treg-Erniedrigung in der Synovialflüssigkeit von betroffenen Kindern [54]. Das von Th17-produzierte IL-17 scheint mit der Krankheitsaktivität zu korrelieren und fördert über eine Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und IL-8, sowie Matrixmetalloproteasen eine Schädigung der kartilaginären Umgebung [55]. IL-17 wirkt synergistisch mit IL-1 und TNF $\alpha$  über den NF- $\kappa$ B-Faktor. Laut Chabaud et al. führt IL-17 selbst zu einer IL-1 und TNF $\alpha$ -Produktion in Makrophagen, was den destruktiven Effekt dieser Zytokine auf Knochen und Knorpel über eine Aktivierung von Osteoklasten und Chondrozyten sowie eine Inhibition von Reparaturmechanismen durch Osteoblasten weiter fördert [56] (vgl. auch Kapitel 1.2.1). Insbesondere die EAA als HLA-B27 assoziierte Erkrankung beruht pathogenetisch auf Mechanismen des angeborenen Immunsystems mit einer ausgeprägten IL-17 und IL-23-Antwort [57]. Der genaue Einfluss der Tregs auf die JIA ist noch umstritten und wird im Kapitel 1.4.1 näher beleuchtet.

#### **1.3.4 Diagnostik**

Die Diagnose der JIA ist eine klinische. Sie erfordert eine gründliche körperliche Untersuchung mit kompletter Gelenkstatushebung, ergänzt durch labormedizinische Untersuchungen und Autoantikörpersuche, eine HLA-B27-Bestimmung sowie differenzialdiagnostischen Ausschluss anderer Erkrankungen (wie beispielsweise eine infektiöse Ursache der Arthritis) und die Ermittlung der Kriterien für die ILAR-Einteilung. Gerade in der Pädiatrie hat sich die Sonographie als bildgebendes Verfahren zur Erfassung von akuten arthritischen Veränderungen, aber auch von Langzeitfolgen als Mittel der Wahl durchgesetzt.

Technische Fortschritte in der MRT- und Ultraschalltechnik versprechen zukünftig eine schnellere und sensitivere Identifizierung von Risikopatienten für erosive Gelenkschäden [42].

Eine Ermittlung des Therapieansprechens erfolgt beispielsweise durch die ACR (American College of Rheumatology)-Response und eine Analyse der Krankheitsaktivität durch den DAS28 (Disease Activity Score, vor allem in der Erwachsenenrheumatologie etabliert), den JADAS (Juvenile Arthritis Disease Activity Score) oder auch den neu entwickelten JAMAR-Score (Juvenile Arthritis Multidimensional Assessment Report) [58].

### **1.3.5 Therapie**

Je nach Verlaufsform und Schweregrad der JIA steht eine Vielzahl an therapeutischen Möglichkeiten zur Verfügung. NSAR (nicht steroidale Antirheumatika) als erster Schritt der Therapie im Falle einer oligoartikulären Verlaufsform sind die Regel [59, 60]. Sie wirken über Hemmung der Cyclooxygenase analgetisch und antiinflammatorisch. Außerdem besteht eine Empfehlung zur intraartikulären Glukokortikoidinjektion mit Triamcinolonhexacetonid unabhängig von der sonstigen Therapie bei aktiver Arthritis [59, 60].

Bei polyartikulärer Verlaufsform oder ausbleibender Besserung erfolgt zumeist die Gabe von Methotrexat (MTX) als Basistherapeutikum, sog. DMARD (Disease modifying antirheumatic drug) erster Wahl [59, 61]. Als Folsäureantagonist hemmt es die Purin-Synthese und wirkt so zytosuppressiv; außerdem hemmt es über eine Adenosinerhöhung die Zytokinproduktion mit folglich antiinflammatorischer Wirkung [62]. Bei vorhandener Enthesitis und Sakroillitis wird MTX nicht als Monotherapie empfohlen. Hier kommen neben NSAR und Biologika beispielsweise Sulfasalazin zum Einsatz [61].

Bei fehlendem Ansprechen der Basistherapie kann das Therapieschema seit einigen Jahren um die Wirkstoffgruppe der Biologika erweitert werden. Die Untergruppe der TNF $\alpha$ -Blocker, vorrangig bestehend aus Etanercept, Infliximab, Golimumab und Adalimumab wird bei persistierender Krankheitsaktivität

zusätzlich zur MTX-Therapie verordnet. Abatacept, ein CTLA-4-Fusionsprotein, das über die Hemmung der T-Zell-Aktivierung seine Wirkung entfaltet, wird nach Versagen einer TNF $\alpha$ -Blocker-Therapie als weitere Option gehandhabt. Ferner liegen neue Optionen in dem IL-6-Inhibitor Tocilizumab sowie der CD20-Hemmung durch Rituximab [59–61]. Für die in der Erwachsenenrheumatologie neu etablierten Janus-Kinase-Inhibitoren wie Tofacitinib oder Baricitinib oder IL-12/23-Inhibitoren Ustekinumab sowie den IL-17-Inhibitor Secukinumab liegen in der pädiatrischen Rheumatologie noch keine ausführlichen Studien vor, weshalb sie in der aktuellen S2k-Leitlinie keine generellen Empfehlungen diesbezüglich ausgesprochen werden [60]. Systemische Glukokortikoide werden aufgrund der zahlreichen Nebenwirkungen nach Möglichkeit vermieden. Anwendung finden sie jedoch regelmäßig bei akuten Schüben der JIA oder zur Überbrückung bis zum Einsetzen der DMARD-Wirkung [61].

Eine Ausnahme im Behandlungsstandard bildet die sJIA, welche in der Regel weniger gut auf MTX oder TNF $\alpha$ -Blocker anspricht. Je nach Schwere der systemischen Beteiligung kann hier gleich mit einer systemischen Glukokortikoidtherapie und einer Biologika-Therapie mit einem IL-1- oder IL-6-Inhibitor begonnen werden [59]. Aufgrund der Pathogenese der sJIA mit starker Dominanz der Zytokine IL-1, IL-6 und IL-18 im inflammatorischen Milieu [43] sind IL-1-Antagonisten und IL-6-Antagonisten besonders effektiv. Beispiele aus diesen Substanzklassen sind Canakinumab (IL-1 $\beta$ -Blocker), Anakinra (IL-1-Rezeptor-Antagonist), Riloncept (IL-1-Rezeptormodulator) und Tocilizumab (IL-6-Rezeptor-Blocker) [63].

Der IL-17-Inhibitor Secukinumab, der in der Erwachsenenrheumatologie bereits regelmäßige und erfolgreiche Anwendung bei Psoriasisarthritis und Spondyloarthritis findet, besitzt seit Dezember 2021 in der pädiatrischen Rheumatologie eine Zulassung für EAA und PsA durch die US Food and Drug Administration (FDA) [64], nachdem die ersten positiven Ergebnisse der Phase III JUNIPERA Studie ein verringertes Schubrisiko unter Secukinumab bei den genannten Gruppen im Vergleich zu Placebo zeigten [65]. In der EU ist das Präparat seit Juni 2022 nun auch bei Kindern mit Psoriasis, PsA und EAA zugelassen [66, 67]. Bei Erwachsenen fanden sich erhöhte IL-17- und Th17-

Spiegel im peripheren Blut insbesondere bei Psoriasis- und Spondyloarthritispatienten [68]. Analog wurden erhöhte IL-17-Spiegel in der Synovialflüssigkeit in EAA-Patienten und Patienten mit polyarthritischer JIA-Form [55] sowie erhöhte IL-17-Konzentrationen im peripheren Blut bei JIA-Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen gemessen [69].

Als grundlegende Therapieprinzipien sind bei allen Formen auf eine gesunde Diät, Physiotherapie und körperliche Bewegung sowie auf einen ausreichenden Impfschutz (Lebendimpfungen unter Immunsuppression kontraindiziert) zu achten [70].

#### **1.4 Autoimmunität am Beispiel der JIA**

Autoimmunität bezeichnet die pathologische Immunantwort des Körpers gegen sich selbst. T- oder B-Zellen werden durch Selbstantigene aktiviert und reagieren autoreaktiv. Normalerweise werden solche autoreaktiven Zellen im Rahmen der immunologischen Toleranz in Schach gehalten. Toleranz wird in zentrale Toleranz und periphere Toleranz unterschieden. Erstgenannte spielt sich im Knochenmark und Thymus ab, in denen Lymphozyten, die Selbstantigene erkennen entweder sterben, den Rezeptor wechseln oder sich zu Tregs entwickeln. Bei der peripheren Toleranz spielt die Apoptose oder die Ruhigstellung (Anergie) der Zelle, die Selbstantigene erkennt, eine Rolle. Weiterhin supprimieren Tregs autoreaktive Zellen. Kippt die Balance zwischen Erregerabwehr und Kontrolle des eigenen Immunsystems, so entstehen durch fehlerhafte Toleranz Autoimmunerkrankungen [3].

Je nach Vorkommen der Selbstantigene, gegen die der Körper bei Autoimmunerkrankungen reagiert, können verschiedenste Erkrankungen resultieren. Beispiele hierfür sind Psoriasis, Multiple Sklerose, Typ 1-Diabetes mellitus, Rheumatoide Arthritis usw. Ca. 5 % der westlichen Bevölkerung sind von Autoimmunerkrankungen betroffen [2].

Abzugrenzen von den Autoimmunerkrankungen sind die Autoinflammatorischen Syndrome, bei denen die primäre Störung im Feld des natürlichen Immunsystems liegt. Es folgt eine sog. Inflammation mit dem Endpunkt

der IL-1 $\beta$ -Sekretion und der daraus resultierenden akuten Entzündung. Überlappungen der Entitäten Autoimmunität und Autoinflammation sind möglich. Ein Beispiel, bei dem die Inflammation im Vordergrund steht, sind die sJIA (= Morbus (M.) Still) und der adulte M. Still [4, 44].

Als zugrundeliegende Ursachen von Autoimmunerkrankungen werden verschiedenste Aspekte diskutiert: genetische Suszeptibilität im Zusammenhang mit HLA- und nicht-HLA-Genpolymorphismen, Mutationen in Genen wie beispielsweise in FoxP3 (mit resultierendem IPEX-Syndrom) auf der einen Seite, Umweltfaktoren wie Hormone oder Trauma und Infektionen auf der anderen Seite. Inwiefern Infektionen Autoimmunerkrankungen triggern oder verstärken ist noch umstritten. Angenommen werden 2 Mechanismen: die begleitende Bystander-Aktivierung von nicht-antigenspezifischen T-Zellen über ein spezifisches Zytokinmilieu und das molekulare Mimikry, bei dem kreuzreaktive Lymphozyten mikrobielle Antigene erkennen, die wiederum Selbstantigenen stark ähneln und daher eine autoimmune Reaktion anstoßen. Andererseits wird eine geringere Infektionslast in den westlichen Ländern mit einer steigenden Autoimmunitätsrate in Zusammenhang gebracht und die Bedeutung der Darmflora für die Entwicklung des Immunsystems diskutiert [3, 4].

Bei der Rheumatoiden Arthritis (RA) und der JIA entsteht die Autoimmunität durch autoreaktive T-Zellen und Autoantikörper gegen Antigene der Gelenkhäute. Der sog. Rheumafaktor (RF), ein von B-Zellen produzierter anti-IgG-Autoantikörper, der jedoch auch bei gesunden Patienten und gleichzeitig nicht bei allen RA-Patienten vorhanden sein kann, lässt folgern, dass nicht nur die B-Zellen an dieser Autoimmunerkrankung beteiligt sind. Dem RF ähnlich sind die sog. ACPAs (anti-citrullinated protein antibodies), Autoantikörper, die sehr spezifisch für die rheumatoide Arthritis sind. Der Zusammenhang mit den HLA-DR-Genen, die wichtig für die MHC-Komplexe und damit für die T-Zell-vermittelte Immunität sind, macht erkennbar, dass autoreaktive T-Zellen ebenfalls eine Rolle spielen können. Es wird vermutet, dass in der frühen Krankheitsphase autoreaktive Th17-Zellen eine essenzielle Rolle spielen. Die produzierten Zytokine, u.a. IL-17A und IL-1 fördern nicht nur die Gewebedestruktion, sondern



stimulieren weitere Komponenten des Immunsystems, wie Neutrophile und Makrophagen [2].

#### **1.4.1 Einfluss der Tregs und Th17-Zellen auf autoimmune Erkrankungen**

Bei der Autoimmunerkrankung Psoriasis ist eine wichtige Rolle der Tregs unumstritten. Zahlreiche Studien haben eine Dysfunktionalität dieser Zellpopulation unterstrichen. Außerdem wurde in den Hautläsionen betroffener Patienten eine Anreicherung von IL-17<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen, also Th17-like Tregs, gefunden [71]. IL-17, ob von Th17-Zellen oder von Th17-like Tregs produziert, wirkt inflammatorisch speziell auf Keratinozyten [68]. Es wird angenommen, dass der Treg-Defekt eine Grundlage für die ungehemmte Effektor-T-Zell-Proliferation sowie die daraus folgende Hautinflammation ist [30].

Im Falle der JIA wird der genaue Einfluss der Tregs auf die Pathogenese noch diskutiert. Es wurden unterschiedliche Ergebnisse bezüglich Treg-Anzahl im peripheren Blut von betroffenen Kindern gefunden. In der Synovialflüssigkeit zeigte sich aber eine Erhöhung der Tregs, wobei die mildere Form der persistierenden Oligoarthritis eine höhere Zellzahl aufwies als die der extended Oligoarthritis [4, 72]. Eine inverse Korrelation zwischen IL-17<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und Tregs stellten beispielsweise Nistala et al. fest [54], wohingegen Wu et al. kein Ungleichgewicht zwischen Th17-Zellen und Tregs postulierten [53]. Höhere Th17-Level wiesen außerdem auf eine längere Zeitspanne bis zum Erreichen eines inaktiven Krankheitsstadiums hin [53]. Auch die Funktionalität der Tregs in JIA-Patienten ist umstritten. Einige Studien postulierten eine gute Suppressionsfunktion der Tregs [73], während andere eine gestörte Suppressionsfunktion der Tregs beobachten [74]. Unumstritten ist jedoch der Einfluss von Tregs, Th17-Zellen und von IL-17 auf Pathogenese und Verlauf der Arthritis [23, 36, 54]. Insbesondere der oligo- und polyartikulären Verlaufsform der JIA wird aktuell eine gestörte Th1/Th17/Treg-Balance als pathophysiologisch wegweisend zugeschrieben [51].

#### **1.4.2 IL-17-Inhibition als Therapieansatz bei Autoimmunerkrankungen**

Es gibt eine Reihe von IL-17A- oder IL-17A/F-Inhibitoren, die derzeit in klinischen Studien getestet werden. Der IL-17A-Inhibitor Secukinumab (Cosentyx®) ist ein monoklonaler humaner Antikörper, der seit 2015 von der Europäischen Arzneimittel Agentur (EMA) zur Erstlinientherapie für mittelschwere bis schwere Plaque-Psoriasis bei Erwachsenen zugelassen ist und seit 2016 auch für Psoriasis-Arthritis und ankylosierende Spondylitis bei Versagen der konventionellen Therapie [75]. Im Bereich der Pädiatrie ist das Präparat durch die FDA und zuletzt im Juni 2022 auch durch die EMA für die schwere Psoriasis, PsA und EAA zugelassen [64, 66, 67]. Der Wirkmechanismus des IL-17A-Inhibitors liegt in der direkten Bindung des Zytokins und damit der Verhinderung der Interaktion mit dem zugehörigen IL-17-Rezeptor. Er entfaltet seine Wirkung vor allem in Erkrankungen, in denen IL-17 eine zentrale Rolle in der Pathogenese spielt. Eine bessere Wirkung bei Psoriasis-Arthritis und ankylosierender Spondylitis als bei der üblichen RA ist vermutlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass IL-17 einen noch größeren pathophysiologischen Einfluss auf Krankheitsentwicklung und -verlauf besitzt [76, 77]. Die stark heterogenen Effekte in RA-Patienten werden z.T. mit HLA-DR-Polymorphismen und unterschiedlichen RF-Leveln in Verbindung gebracht [68]. In Experimenten wurde anti-IL-17 jedoch auch eine direkte Besserung der Arthritis und entzündeten Synovia zugeschrieben bei gleichzeitiger Verringerung von IL-6 und IL-1 [68, 78]. In der JIA wird eine Therapie mit anti-IL-17 v.a. bei Formen mit hohen IL-17-Spiegeln wie der EAA oder der PsA als erfolgsversprechend angesehen, bei beispielsweise der oligoartikulären Form der JIA mit Th1/Th17/Treg-Imbalance, jedoch niedrigeren IL-17-Spiegeln, als weniger erfolgsversprechend [27].

IL-17-Inhibition greift jedoch grundlegend in die Th17/Treg-Achse in der Pathogenese autoimmuner Erkrankungen ein und verschiebt sie zugunsten der Tregs. Weitere Angriffspunkte in der Therapie sind die Inhibition von IL-1, IL-6, IL-23 oder deren Rezeptoren und damit die Inhibition der Differenzierung und

Aufrechterhaltung des Th17-Phänotyps sowie die Beeinflussung der Transkriptionsfaktoren wie ROR $\gamma$ t und STAT3 [19].

## 2 Zielsetzung und Fragestellung

Der Einfluss der Tregs in Autoimmunerkrankungen wie der JIA ist unumstritten, auch wenn ihre genaue Rolle noch nicht bis ins Detail geklärt ist. Dabei konnte in zahlreichen Arbeiten eine enge Beziehung der Tregs zu den IL-17-produzierenden Th17-Zellen gezeigt werden, welche ebenfalls eine wichtige Bedeutung in der Pathogenese der JIA besitzen. Die in den letzten Jahren erforschte Plastizität der Tregs in bestimmten Umgebungsmilieus weist neue Aspekte eben dieser Treg/Th17-Beziehung auf. Der Einfluss des zentralen Zytokins der Th17-Zellen, IL-17, auf die Population der Tregs wurde dabei jedoch noch nicht beleuchtet. Ob IL-17 oder dessen Hemmung einen signifikanten Einfluss auf die Suppressionsfunktion von Tregs oder die Stabilität ihres Phänotyps besitzt, ist noch unbekannt. Insbesondere in Anbetracht des starken Einflusses von IL-17 auf die Arthritis und der neuen Therapiemöglichkeiten mit IL-17-Inhibitoren, die in einigen Krankheitsentitäten der Rheumatologie bereits große Wirksamkeit erweisen, will diese Arbeit daher den Einfluss von IL-17 sowie den Einfluss seines Inhibitors auf Tregs genauer untersuchen.

Ebenso ist nicht bekannt, ob Th17-induzierende Faktoren zu phänotypischen oder funktionellen Veränderungen der Tregs in JIA-Patienten führen. Da in bestimmten inflammatorischen Milieus Tregs Th17-Eigenschaften wie eine IL-17-Produktion annehmen können und möglicherweise sogar ihre eigentlichen Treg-Funktionen bzw. ihren Phänotyp verlieren können, soll zudem der genaue Einfluss eines Th17-stimulierenden, proinflammatorischen Kulturmilieus auf Tregs betrachtet werden.

Wichtig für den Vergleich des Einflusses der genannten Stimuli ist dabei zunächst die Grundanalyse der zirkulierenden Lymphozyten im peripheren Blut (Lymphozytenpools). Außerdem besteht eine bisher sehr variable Datenlage hinsichtlich der Th1/Th17/Treg-Balance bei JIA-Patienten, einzelnen JIA-Subpopulationen und gesunden Kontrollen. Aus diesem Grund erfolgt eine detaillierte Untersuchung und Charakterisierung etwaiger Unterschiede im Lymphozytenpool von gesunden Kontrollen, Patienten sowie JIA-

Subpopulationen zur Erlangung eines tieferen pathophysiologischen Verständnisses.

Als Ziele der vorliegenden Arbeit wurden daher definiert:

- Charakterisierung der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen mit Analyse der quantitativen und qualitativen Unterschiede zwischen JIA-Patienten, JIA-Subpopulationen und gesunden Kontrollprobanden.
- Bestimmung des Einflusses von IL-17, anti-IL-17 und eines Th17-stimulierenden Kulturmilieus auf Phänotyp (Zelloberflächenmarker) und FoxP3-Expression der Tregs von JIA-Patienten und gesunden Kontrollen.
- Bestimmung des Einflusses von IL-17, anti-IL-17 und eines Th17-stimulierenden Kulturmilieus auf die Funktionalität (Zytokinproduktion und Suppressionsfunktion) der Tregs von JIA-Patienten und gesunden Kontrollen.

### 3 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden zunächst unter 3.1 sämtliche verwendete Materialien und Geräte inklusive Produktnummern und Herstellern tabellarisch aufgelistet und anschließend unter 3.2 die experimentellen Abläufe und statistischen Tests ausführlich erörtert.

#### 3.1 Material

Dieses Unterkapitel listet tabellarisch die verwendeten Geräte, die Verbrauchsmaterialien, Isolierungskits, Zytokine, Antikörper, Lösungen und Medien sowie Chemikalien und Gase in alphabetischer Reihenfolge auf.

##### 3.1.1 Geräte

Sämtliche Geräte und Instrumente, die für die experimentelle Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 4 dargestellt.

**Tabelle 4: Geräte**

Gerät	Produktname	Hersteller	Katalog-/Produkt-Nr.
<b>Autoklav</b>	Systec DX-65	Systec GmbH, Linden, Deutschland	D3589
<b>Durchflusszytometer</b>	FACS Canto II	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	338962
<b>Flockeneisbereiter</b>	AF 103	Scotsman Ice, Mailand, Italien	474-0110
<b>Gefrierbehälter</b>	Nalgene Cryo Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, Langensfeld, Deutschland	51000001
<b>Inkubator</b>	B 5060 EK-CO2	Heraeus Hanau, Deutschland	50001834
<b>Kohlenstoffdioxidtank</b>	CO <sub>2</sub> , 10 l Tank, 100 bar	Rießner-Gase GmbH, Lichtenfels, Deutschland	
<b>Kühlschrank</b>	Liebherr Kühl- Gefrierkombination, CN 3866, 4 °C	Liebherr- International AG, Bulle, Schweiz	3866-20B-001
	Liebherr Comfort G3013/20, -20 °C	Liebherr- International AG, Bulle, Schweiz	28.084.459.2

Gerät	Produktname	Hersteller	Katalog-/Produkt-Nr.
	Hera Freeze -80 °C	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland	51019576
<b>Laborpumpe</b>	Laborport Mini-Laborpumpe	KNF Neuberger, Freiburg, Deutschland	N86KN.18
<b>Magnetic Cell Separation (MACS)</b>	VarioMACS™	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-090-282
<b>Magnetrührer</b>	MR 3001	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland	504-10000-001
<b>Mikroskop</b>	Wilovert S 30	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland	1010335
<b>pH-Meter</b>	pH523	WTW, Weilheim i. OB, Deutschland	09070190
<b>Pipette</b>	PipetBoy	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland	101713
	PipetBoy acu	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland	200464
	Research 0,1-2,5 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	326522
	Research 10-100 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	238181
	Research 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	327557 (steril)
	Research plus 0,5-10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	492499Z (steril) 125887A
	Research plus 2-20 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	254135Z (steril) 125887A
	Research plus 10-100 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	493057Z (steril) 129374A
	Research plus 20-200 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	379067Z (steril)
	Research plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	494528Z
	Multipipette Plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	F166054J

Gerät	Produktname	Hersteller	Katalog-/Produkt-Nr.
<b>Sicherheitswerkbank</b>	Gelaire BSBS 6A – Laminar Flow Hood	Flow Laboratories GmbH, Meckenheim, Deutschland	11031
<b>Stickstofftank</b>	Arpege 55- Lagerungssystem	Air Liquide, Paris, Frankreich	
	Vakuum- superisolierter Flüssig-Stickstofftank 200-VL/R	Cryoson GmbH, Schöllkrippen, Deutschland	941744
<b>Vortexmischer</b>	RetschMixer	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland	
<b>Waage</b>	Sartorius CP124S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland	16208517
	TP3002	Denver Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland	09070190
<b>Wasserbad</b>	GFL Typ 1003	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland	10549879
<b>Zählkammer</b>	Neubauer- Zählkammer	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland	ZK06
<b>Zentrifuge</b>	Rotanta/K	Hettich Holding GmbH, Tuttlingen, Deutschland	2260
	Universal 32R - Typ 1610	Hettich Holding GmbH, Tuttlingen, Deutschland	0000645

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Im Folgenden werden alle für die Versuche genutzten Verbrauchsmaterialien in Tabelle 5 aufgelistet.

**Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien**

Material	Produktname	Hersteller	Katalog-/Produkt-Nr.
<b>Blutentnahmesystem</b>	EDTA-Monovette	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland	05.1167
	NH <sub>4</sub> -Heparin- Monovette	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland	02.1064
	Z-Gel-Monovette	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland	03.1524



Material	Produktname	Hersteller	Katalog- /Produkt-Nr.
	Safety-Multifly 21 G	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland	85.1638.235
<b>Einfrierröhrchen</b>	CryoTubes™	VWR, Radnor, USA	10018-734
<b>Einmalpipette</b>	Cellstar® Serological Pipette sterile, 10 ml	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland	607180
<b>FACS-Tube</b>	Falcon® 5 ml Rundbodenröhrchen, Polystyrol	Corning Science México, Reynosa, Mexiko	352008
<b>Glaspipette</b>	Fortuna Messpipette 5 ml :0,05	Poulten & Graf GmbH, Wertheim am Main, Deutschland	1 10032404
	Fortuna Messpipette 10 ml :0,1	Poulten & Graf GmbH, Wertheim am Main, Deutschland	1 10037404
	Fortuna Messpipette 20 ml :0,1	Poulten & Graf GmbH, Wertheim am Main, Deutschland	1 10041402
<b>Handschuhe</b>	Dermagrip® Vinyl Examination Gloves	WRP, Sepang, Malaysien	D1501-11
<b>MACS-Columns</b>	LD Column	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-042-901
	MS Column	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-042-201
<b>Pipettenspitzen</b>	Biosphere® Filter Tips 0,1-10 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland	70.1130.210
	Biosphere® Filter Tips 2-200 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland	70.760.211
	Biosphere® Filter Tips 100-1000 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland	70.762.211
	Eppendorf Combitips advanced® 5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	0030089669
	Eppendorf Combitips 50 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	0030069277
<b>Reagiergefäß</b>	SafeSeal Gefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland	72.706
	SafeSeal Gefäß 0,5 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland	72.704

Material	Produktname	Hersteller	Katalog-/Produkt-Nr.
<b>Schraubröhrchen (Serum)</b>	Mikro-Schraubröhre, 1,5 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland	72.692.005
<b>Sterilfilter</b>	Nalgene Rapid Flow	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland	291-4520
<b>Zellkulturplatten</b>	96 Well Cell Culture Plate U-Bottom	VWR, Radnor, USA	10062-902
<b>Zellfilter</b>	Easy-Strainer 70 µm	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland	542070
<b>Zentrifugenröhrchen</b>	Cellstar® Tube 15 ml	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland	188271
	Cellstar® Tube 50 ml	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland	227261

### 3.1.3 Isolierungskit

Für die Isolierung der Tregs wurde das Treg-Kit II von Miltenyi Biotec verwendet, welches in Tabelle 6 beschrieben ist.

**Tabelle 6: Treg-Isolierungskit**

Kit	Beschreibung	Hersteller	Katalog-/Produkt-Nr.
<b>MACS-Kit II Treg Cell Isolation</b>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>dim/-</sup>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-094-775

### 3.1.4 Antikörper, Zytokine, Stimulantien, Hemmstoffe und weitere chemische Verbindungen

In Tabelle 7 werden die unterschiedlichen Antikörper (anti-CD3-Antikörper bis Secukinumab), Zytokine (IL-1β bis TGFβ1), Stimulantien (Ionomycin und PMA), Hemmstoffe (Brefeldin A) und sonstige chemischen Verbindungen (CFSE) erfasst, welche für die Kulturansätze der Arbeit benutzt wurden.

**Tabelle 7: Antikörper, Zytokine, Stimulantien, Hemmstoffe und weitere chemische Verbindungen zur Kultivierung der Zellen**

<b>Antikörper/Zytokin/ Stimulanz/Hemmstoff/ chemische Verbindung</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalog- /Produkt-Nr.</b>
<b>Anti-CD3-Antikörper</b>	LEAF™ Purified anti-human CD3 Antibody, Klon: OKT3	BioLegend, San Diego, USA	Cat: 317315 Lot: B225107
<b>Anti-CD28-Antikörper</b>	LEAF™ Purified anti-human CD28 Antibody Klon: CD28.2	BioLegend, San Diego, USA	Cat: 302923 Lot: B247405
<b>Anti-IL-17A</b>	Anti-Interleukin-17A, Klon eBio64CAP17	Invitrogen Thermo Fisher	REF: 16717885 Lot: 4344992
<b>Secukinumab</b>	Cosentyx® 150 mg Injektionslösung	Novartis	SF996 S0014A
<b>IL-1β</b>	Recombinant Human Interleukin-1β	BioLegend, San Diego, USA	Cat: 579404 Lot: B213360
<b>IL-6</b>	Recombinant Human Interleukin-6	BioLegend, San Diego, USA	Cat: 570804 Lot: B226168
<b>IL-17A</b>	Recombinant Human Interleukin-17A	BioLegend, San Diego, USA	Cat: 570504 Lot: B205785
<b>IL-23</b>	Recombinant Human Interleukin-23	BioLegend, San Diego, USA	Cat: 574102 Lot: B215828
<b>TGF-β1</b>	Recombinant Human Transforming Growth Factor β1	BioLegend, San Diego, USA	Cat: 580704 Lot: B225284
<b>Ionomycin</b>		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	I0634-1MG
<b>PMA</b>	Phorbol 12-myristate 13-acetate	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P1858-1MG
<b>Brefeldin A</b>		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	B6542-5MG
<b>CFSE</b>	Carboxyfluoreszeindiacetat-Succinimidylester	BioLegend, San Diego, USA	Cat: 422701 Lot: B181903

### 3.1.5 Antikörper zur Zellfärbung

Die für die intrazellulären und Oberflächenfärbungen verwendeten Antikörper werden in Tabelle 8 aufgelistet. Zunächst werden die Färbe-Antikörper gegen Oberflächenmoleküle wie Cluster of differentiation (CD) oder Rezeptoren aufgezählt (CCR6 bis CXCR3), anschließend werden intrazellulär Färbungen gegen Transkriptionsfaktoren (FoxP3 und RORγt), zytotoxische Proteine (Granzym B und Perforin), Zytokine (IFNγ bis TNFα) sowie das Zombie-Dye beschrieben.

**Tabelle 8: Antikörper zur Zellfärbung**

<b>Antikörper</b>	<b>Farbe</b>	<b>Klon</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Chargen/Cat-Nr.</b>	<b>Katalog/Lot-Nr.</b>
<b>CCR6</b>	APC	G034E3	BioLegend, San Diego, USA	353416	B189862
	PerCP/Cy5.5	G034E3	BioLegend, San Diego, USA	353406	B205287
<b>CCR7</b>	APC/Cy7	G043H7	BioLegend, San Diego, USA	353212	B219213
<b>CD127</b>	APC/Cy7	A019D5	BioLegend, San Diego, USA	351348	B224095
	BV421	A019D5	BioLegend, San Diego, USA	351310	B226832
<b>CD161</b>	APC	HP-3G10	BioLegend, San Diego, USA	339912	B200987
<b>CD25</b>	PE/Cy7	BC96	BioLegend, San Diego, USA	302612	B231345
<b>CD27</b>	PE/Cy7	LG.3A10	BioLegend, San Diego, USA	124216	B218389
<b>CD4</b>	APC	OKT4	BioLegend, San Diego, USA	317416	B217365
	APCFire	SK3	BioLegend, San Diego, USA	344638	B229075
	BV421	OKT4	BioLegend, San Diego, USA	317434	B187127
	FITC	OKT4	BioLegend, San Diego, USA	317408	B176551
<b>CD45RA</b>	FITC	HI100	BioLegend, San Diego, USA	304106	B202186
<b>CD8</b>	APC-H7	SK1	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	560179	6140812
	PE/Cy7	SK1	BioLegend, San Diego, USA	344712	B216883
	PerCP/Cy5.5	SK1	BioLegend, San Diego, USA	344710	B238358
<b>CXCR3</b>	PE	G025H7	BioLegend, San Diego, USA	353706	B197483

Antikörper	Farbe	Klon	Hersteller	Chargen/Cat-Nr.	Katalog/Lot-Nr.
<b>FoxP3</b>	PE	259DIC7	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	560046	7096848
<b>RORyt</b>	APC/Cy7	AFKJS-9	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	17-6988-82	E10458-1631
<b>GranzymB</b>	APC		Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-101-346	5140521092
<b>Perforin</b>	PE		Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-096-578	5140521082
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	FITC	4S.B3	BioLegend, San Diego, USA	502506	B179400
	PE		Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-540-201	5150112265
<b>IL-10</b>	APC	JES3-19F1	BioLegend, San Diego, USA	506807	B193895
<b>IL-17A</b>	BV421	BL168	BioLegend, San Diego, USA	512322	B231952
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	FITC	MAb11	BioLegend, San Diego, USA	502906	B147230
<b>Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit</b>	Aqua Dye		BioLegend, San Diego, USA	77143	B223424

### 3.1.6 Lösungen und Medien

In Tabelle 9 werden die flüssigen Medienbestandteile (DMSO bis RPMI), Trennmedien (Ficoll) und Pufferlösungen (Fixation und Permeabilization Buffer) verzeichnet, in Tabelle 10 die festen Pufferbestandteile zusammengefasst, sowie in Tabelle 11 die Beschreibungen zur Herstellung von gebrauchsfertigen Lösungen dargestellt.

**Tabelle 9: Flüssige Medienbestandteile, Trennmedien und Puffer**

Lösung/Medium	Beschreibung	Hersteller	Katalog-/Produkt-Nr.
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	337260930
<b>FBS superior</b>	Fetal bovine serum	Biochrom AG, Berlin, Deutschland	S0615/0973F
<b>Penicillin-Streptomycin</b>	Pen/Strep-PreMix, Cellpure <sup>R</sup> HP10.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	197258696
<b>RPMI</b>	RPMI-1640 Medium with L-glutamine and sodium bicarbonate	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	R8758-500ML
<b>Ficoll</b>	FicoLite-H	Linaris blue GmbH, Wertheim, Deutschland	Cat: GTF1511KYA Lot: 151132P
<b>Fixation Buffer</b>	Diluent Buffer	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	Cat: 51-9008101 Lot: 7146724
	Fix/Perm <sup>TM</sup> Buffer (4x)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	Cat: 51-9008100 Lot: 7146723
<b>Permeabilization Wash Buffer</b>	BD Perm/Wash <sup>TM</sup> Buffer (10x)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	Cat: 51-9008102 Lot: 7251647

**Tabelle 10: Feste Pufferbestandteile**

Feststoffname	Beschreibung	Hersteller	Katalog-/Proukt-Nr.
<b>BSA</b>	Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	A9647-100G
<b>PBS</b>	Phosphate-buffered-saline Tablets	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA	18912-014

**Tabelle 11: Gebrauchsfertige Lösungen**

Lösung	Beschreibung
<b>Einfriermedium</b>	RPMI + 1% Pen/Strep + 20% FBS + 10% DMSO
<b>Erythrozyten-Lyse-Puffer</b>	8,02 g NH <sub>4</sub> Cl + 0,84 g NaHCO <sub>3</sub> + 0,37 g EDTA in 1 l destilliertes Aqua, pH-Adjustierung auf 7,3
<b>FACS-Puffer</b>	0,5% BSA + 0,01% NaN <sub>3</sub> + 2 PBS Tabletten in 1000 ml destilliertes Aqua
<b>MACS-Puffer</b>	0,5% BSA + 584,8 mg EDTA + 2 PBS Tabletten in 1000 ml destilliertes Aqua, pH-Adjustierung auf 7,2
<b>Nährmedium</b>	RPMI + 1% Pen/Strep + 10% FBS
<b>PBS-Lösung</b>	je 1 Tablette pro 500 ml destilliertes Aqua

### 3.1.7 Chemikalien und Gase

Zuletzt werden in Tabelle 12 die gebrauchten Chemikalien und in Tabelle 13 die benutzten Gase aufgelistet.

**Tabelle 12: Chemikalien**

Chemikalienname	Hersteller	Katalog-/Produkt-Nr.
Ammoniumchlorid $\text{NH}_4\text{Cl}$	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	A-4514
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland	152918061
Ethanol 70% vergällt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	T913.3
Ethylendiamintetraessigsäure EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	E-5134
Isotonische Kochsalzlösung, 0,9 NaCl	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland	19KM01GB
Natriumazid $\text{NaN}_3$	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	S-8032
Natriumhydrogencarbonat $\text{NaHCO}_3$	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	6329
2-Propanol	VWR, Radnor, USA	20839.366
Trypanblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.11732.0025

**Tabelle 13: Gase**

Gas	Beschreibung	Hersteller
Kohlensstoffdioxid	Kohlensstoffdioxid 4.5, Typ 10, tiefkalt, verflüssigt	Rießner-Gase GmbH, Lichtenfels, Deutschland
Stickstoff	Flüssig-Stickstoff	Cryoson GmbH, Schöllkrippen, Deutschland

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Ethikvotum

Vor Beginn der Arbeit wurde das medizinische Forschungsprojekt durch das lokale Ethikkomitee der Universitätsklinik Würzburg (Ethikvotum Nr. 239/10) genehmigt. Alle Probanden, bei Minderjährigen auch die Sorgeberechtigten, wurden in einem ausführlichen Gespräch persönlich aufgeklärt und erhielten eine Informationsbroschüre über die Inhalte der Studie. Anschließend folgte bei Einverständnis die Unterzeichnung einer Erklärung durch den Probanden sowie ggf. den Sorgeberechtigten. Die Studie selbst wurde nach den Kriterien der Deklaration von Helsinki 2013 [79] durchgeführt und beruft sich auf die Prinzipien der Good Clinical und Good Laboratory Practice.

### 3.2.2 Studiendesign

Die Studie wurde als explorative prospektive kontrollierte Kohortenstudie durchgeführt. Die Hypothese lautete zum einen, dass eine verschobene Treg/Th17-Balance peripherer Lymphozyten in der JIA-Kohorte vorherrscht. Zum anderen lautete die Hypothese, dass im Th17-Milieu eine Plastizität der Tregs beobachtet werden kann, mit Wandlung hin zum proinflammatorischen Phänotyp und einer verminderten Suppressionsfunktion, sowie dass die Stimulation und die Blockade von IL-17 einen Effekt auf Tregs haben kann. Analog wurden als Nullhypothesen festgelegt, dass sich keine Unterschiede in der Verteilung der peripheren Lymphozyten zwischen JIA und Kontrollprobanden finden lassen und dass weder das Th17-, noch das IL-17-, oder das anti-IL-17-Milieu einen Einfluss auf Phänotyp und Funktion der Tregs haben.

### 3.2.3 Probanden

Insgesamt wurden für die Studie 10 gesunde Kontrollen und 16 Patienten rekrutiert. Ein- und Ausschlusskriterien zur Studienteilnahme sind in Tabelle 14 dargestellt.

**Tabelle 14: Ein- und Ausschlusskriterien Probanden**

<b>Einschlusskriterien (JIA)</b>	<b>Ausschlusskriterien (JIA und Gesunde)</b>
JIA entsprechend der internationalen Kriterien	Malignome
	Z. n. Transplantation
	Hämatologische Erkrankungen
	Monogenetische Syndrome
	Schwere Infektionen in den vorangegangenen 3 Monaten
	Schwere Allergien

#### 3.2.3.1 JIA-Probanden

Die Gewinnung des Probenmaterials, nämlich des Vollblutes der Probanden, erfolgte bei erkrankten Personen, die die ILAR-Kriterien einer JIA erfüllten (vgl. Kapitel 1.3.1), im Zeitraum von März bis April 2017 im Deutschen Zentrum für Kinder- und Jugendrheumatologie in Garmisch-Partenkirchen. Nach Einwilligung



zur Studienteilnahme wurde bei den durch die Doktorandin akquirierten Patienten die Probenentnahme im Rahmen von Routineblutentnahmen durchgeführt. Die Krankheitsaktivität wurde mittels JADAS [80] bestimmt, zusätzlich wurden eine Anamnese und eine klinische Untersuchung durchgeführt, sowie Werte des Routinelabors erhoben. Die demographischen und klinischen Daten der Patienten sind in Kapitel 4.2 ausführlich dargestellt.

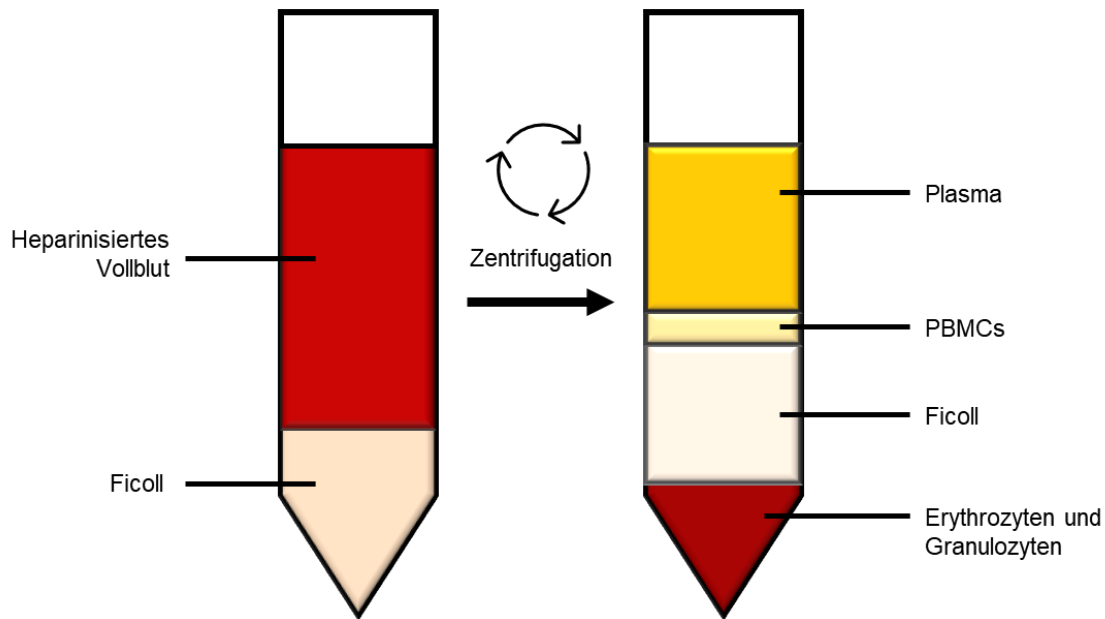
### 3.2.3.2 *Kontrollprobanden*

Die Probenmaterialgewinnung der immunologisch gesunden Kontrollen erfolgte an der Universitätsklinik Würzburg. Da die JIA-Patienten eher ein jüngeres Alter haben, wurde bei der Rekrutierung der Kontrollgruppe ein ebenfalls eher jüngeres Alter angestrebt, jedoch sollten die Kontrollprobanden selbst volljährig sein. Die demographischen Daten der gesunden Kontrollen sind in Kapitel 4.2 näher beschrieben.

### 3.2.4 **Ficoll Dichtegradientenzentrifugation**

Um aus dem abgenommenen heparinisierten Blut der Probanden die peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) zu isolieren, wurde eine Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll-Separation durchgeführt. Diese Methode wurde von A. Bøyum [81] etabliert und bedient sich der unterschiedlichen Dichte der einzelnen Blutbestandteile. Die allgemeine Funktionsweise der Zentrifugation beruht darauf, dass die Partikel, beispielsweise die Zellen, durch die Einwirkung der Rotorkraft sedimentieren. Je nach Form, Dichte und Viskosität des Mediums unterscheidet sich hierbei der Sedimentationskoeffizient eines Partikels. Ähneln sich jedoch die einzelnen Bestandteile eines Mediums sehr, so genügt die Differenzial-Zentrifugation allein nicht mehr. Man benötigt ein Medium, das durch Erzeugung eines Dichtegradientens die Unterscheidung der verschiedenen Dichten der Partikel ermöglicht. Das Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer FicoLite-H besitzt mit 1,077 g/ml eine geringere Dichte als Erythrozyten und Granulozyten, jedoch eine größere Dichte als Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten [82]. Dies hat zur Folge, dass Erythrozyten und Granulozyten am Boden sedimentieren,

wohingegen sich die PBMCs in der Interphase zwischen Medium und Plasma anreichern. Die Thrombozyten befinden sich ebenfalls oberhalb der Ficoll-Schicht, verbleiben aber aufgrund ihrer geringen Größe im Plasma. Zur Dichtegradientenzentrifugation wurde unter sterilen Bedingungen in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen 9 ml Ficoll vorgelegt und vorsichtig mit einer Einmalpipette mit 18 ml heparinisiertem Vollblut überschichtet. Hieraus ergab sich ein 1/3 Ficoll zu 2/3 Blut Verhältnis. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 25 min bei Raumtemperatur und 1700 rpm. Wichtig hierbei ist das Ausschalten der Bremse, da so eine Vermischung des aufgebauten Gradienten verhindert wird. Nach der Zentrifugation erhielt man eine Schichtung ähnlich wie in Abbildung 7 dargestellt. Der PBMC-Ring konnte mittels Glaspipette direkt von der Oberfläche der Ficollschicht abgeerntet werden. Da das synthetische Saccharose-Polymer zytotoxisch ist, erfolgte ein Waschschrift mit 0,9 %igem NaCl durch 10 min Zentrifugation bei 1700 rpm. Nach Absaugen des Überstandes wurde das sedimentierte Zellpellet in sterilem hypotonen Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert und 5 min inkubiert, um eventuelle Erythrozytenkontaminationen der PBMCs zu beseitigen. Da bei zu langer Inkubation mit dem Lyse-Puffer auch die PBMCs Lyse-gefährdet sind, wurde die Reaktion mit 10 ml Nährmedium gestoppt und die Zellen nochmals für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert.



**Abbildung 7: Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation**

Die dargestellte Schichtung entspricht den unterschiedlichen Lokalisationen der Medien und Zellen vor bzw. nach Zentrifugation.

Modifiziert nach [82]]

### 3.2.5 Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer

Um die gewonnenen PBMCs zu quantifizieren, wurde das resultierende Zellpellet in 5 ml Nährmedium resuspendiert und mittels Neubauer-Zählkammer die Anzahl lebender Zellen bestimmt. Hierfür wurden 5 µl der Zellsuspension mit 95 µl Trypanblau in einem 0,5 ml Reagiergefäß gut durchmischt und davon 10 µl in die Zählkammer überführt. Bei intakter Zellmembran, sprich lebenden Zellen, kann das Trypanblau nicht ins Zytoplasma vordringen. Vitale Zellen sind in der Mikroskopie farblos. Die Neubauer-Zählkammer besteht aus vier großen Quadraten à 0,1 µl Volumen. Um einen guten Mittelwert der Zellzahl zu erhalten, sollten mindestens zwei, bei niedriger Zellzahl vier Großquadrate gezählt und gemittelt werden. Danach errechnete sich die PBMC-Zahl über folgende Formel:

$$\text{Gezählte Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor (hier 20)} \times 10^4 (\text{da } 0,1 \mu\text{l Volumen}) \times \\ \text{Zellsuspensionsvolumen (hier 5 ml)} = \text{Gesamtzahl der Zellprobe}$$

Dieses Zählverfahren wurde analog bei allen anderen Zählritten durchgeführt.

### **3.2.6 Einfrier- und Auftauverfahren sowie Kryokonservierung**

Um nachfolgende Experimente zeitlich unabhängig durchführen zu können, wurden die gewonnenen PBMCs kryokonserviert. Das verwendete Einfriermedium enthielt als Kryoprotektivum 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO), welches bei Raumtemperatur zytotoxische Effekte besitzt [83]. Ein zügiges Einfrieren und Auftauen ist daher nötig, um Zellverluste zu vermeiden. Zum Einfrieren wurden pro Einfriereröhrchen  $5 \times 10^6$  Zellen in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in Einfrierbehältern für mindestens 48 h bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei  $-196\text{ }^\circ\text{C}$  konserviert.

Das Auftauen der benötigten Zellen, welche in Eisboxen vom Stickstofftank ins Labor gebracht wurden, erfolgte ebenfalls zügig im  $37\text{ }^\circ\text{C}$  warmen Wasserbad und mit sofortiger Überführung in angewärmtes Nährmedium (je nach Zellzahl 10-20 ml). Um das toxische Einfriermedium zu beseitigen, wurden die Zellen für 5 min bei 1500 rpm gewaschen und das resultierende Pellet in 5 ml Nährmedium resuspendiert. Um die genaue Zellzahl der nach dem Auftauprozess noch vitalen Zellen zu ermitteln, wurde im Anschluss eine Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer durchgeführt.

### **3.2.7 Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) Treg-Isolierung**

Für die Zellkulturansätze war es zunächst nötig, aus den durch die Dichtegradientenzentrifugation erhaltenen PBMCs Tregs zu isolieren. Hierfür wurde das sog. Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) verwendet. Etabliert durch Stefan Miltenyi [84] beruht diese Methode auf der Markierung von Zellen mit magnetischen Mikropartikeln, die anschließend in einer magnetischen Säule separiert werden. Ein MACS-Gerät besteht aus einem permanent aktiven Magnetsystem, in das Säulen verschiedener Größe hineingegeben werden können. Die Säulen sind aus ummantelter Stahlwolle, um den hindurchtretenden Zellen so wenig Schaden wie möglich zuzufügen. Aufgrund der ferromagnetischen Eigenschaften der Stahlwolle wird eine Säule im Magnetsystem magnetisch aufgeladen. In dieser magnetischen Säule werden Zellen, die in vorherigen Arbeitsschritten mit superparamagnetischen Perlen

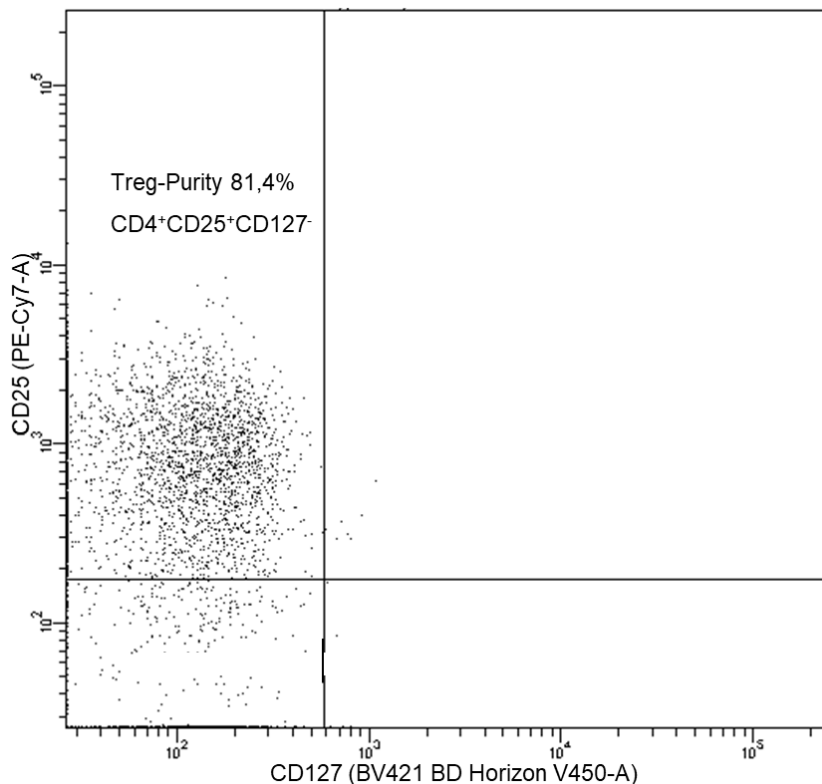
(MicroBeads) markiert wurden, zurückgehalten. Wird jedoch das äußere Magnetfeld entfernt, verliert die Stahlwolle ihre magnetische Eigenschaft und die markierten Partikel können durch die Säule hindurchtreten.

Sämtliche Arbeitsschritte wurden unter der Laminar Flow Hood durchgeführt, um ein steriles Vorgehen zu gewährleisten. Im Detail wurden für die Treg-Isolierung die aufgetauten PBMCs zunächst gezählt, insbesondere da die Zellzahl der vitalen Zellen wichtig für die jeweiligen Mengen der Reagenzien und Puffer war, gefiltert und mit 10 ml MACS-Puffer für 7 min bei 1500 rpm gewaschen. Das nach Absaugen des Überstandes verbleibende Zellpellet wurde in je 40 µl MACS-Puffer pro  $10^7$  Zellen resuspendiert und mit je 10 µl CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>dim/-</sup> Biotin-Antikörper-Cocktail markiert und für 5 min bei 4 °C inkubiert. Der Cocktail enthält Antikörper gegen humanes CD8, CD19, CD123 und CD127. Im Anschluss wurden die Zellen mit je 30 µl MACS-Puffer und 20 µl Anti-Biotin MicroBeads pro  $10^7$  Zellen gemischt und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Nach dem Waschen mit 1 ml MACS-Puffer bei 1200 rpm für 5 min wurde das resultierende Pellet in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert und in eine durch Spülung mit 2 ml MACS-Puffer vorbereitete, ins Magnetfeld gesetzte LD-Säule einpipettiert. Die zuvor markierten CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD123<sup>+</sup> und CD127<sup>+</sup> Zellen wurden so aus der Zellsuspension entfernt. Die aufgefangenen unmarkierten Zellen entsprachen somit einer angereicherten CD4<sup>+</sup> Zellfraktion (sog. negative Selektion). Um die restlichen CD4<sup>+</sup> Zellen aufzufangen, wurde die Säule zweimal mit je 1 ml MACS-Puffer gespült. Diese Zellsuspension wurde bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert und das Pellet nach Absaugen des Überstandes mit je 90 µl MACS-Puffer und 10 µl CD25 MicroBeads pro  $10^7$  Zellen gemischt. Nach 15-minütiger Inkubationszeit im Kühlschrank wurden die Zellen nochmals mit 1-2 ml MACS-Puffer bei 1200 rpm für 5 min gewaschen, der Überstand abgesaugt und die Zellen mit 500 µl MACS-Puffer in Suspension gegeben. Im Anschluss wurden die Zellen auf eine bereits mit 500 µl MACS-Puffer gespülte und im Magnetfeld angebrachte MS-Säule gegeben und diese dreimal mit je 500 µl MACS-Puffer gewaschen, um eine möglichst hohe Reinheit der MicroBeads-Positivfraktion zu erlangen. Da in diesem Schritt der positiven Selektion die CD25<sup>+</sup> Zellen im Magnetfeld der Säule verbleiben, musste die MS-Säule zur Gewinnung besagter

Zellfraktion durch Herausnehmen aus dem Feld demagnetisiert werden. Die MS-Säule wurde hierzu auf ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gesetzt und 1 ml MACS-Puffer aufpipettiert. Durch schnelles und sofortiges Aufdrücken eines Stempels wurden die CD25<sup>+</sup> Zellen von den Stahlwollfasern abgetrennt. Die nun aufgefangenen Zellen entsprachen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>dim/-</sup> Tregs [85]. Diese wurden in der Neubauer-Zählkammer in 1:2 Verdünnung gezählt. Abhängig von der Größe des zur Verfügung stehenden Probenmaterials sowie der daraus resultierenden Anzahl der aufgetauten vitalen PBMCs konnten zwischen 55000 und 460000 Tregs gewonnen werden, bei einem Mittelwert von 146667 (Standardabweichung=99968, Median=90000).

### **3.2.8 Reinheitsmessung der isolierten Tregs**

Die durch die MACS-Isolierung gewonnenen Zellen wurden auf ihre Reinheit geprüft, indem sie mit CD4-APC-, CD127-BV421- und CD25-PE/Cy7-Antikörpern, sowie Zombie-Lösung oberflächenmarkiert wurden. Als Negativkontrolle dienten die bei der Positivselektion zunächst aufgefangenen CD25<sup>-</sup> Zellen. Je 20 µl der jeweiligen Zellsuspension wurden mit 30 µl eines Antikörpermixes aus je 0,6 µl Antikörper in 60 µl PBS und 30 µl einer Zombiefärbung aus 0,25 µl Zombie in 125 µl PBS (entspricht 1:500 Verdünnung) gemischt und für 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Waschschrift mit 1 ml PBS bei 1500 rpm für 5 min und die abschließende Resuspension der resultierenden Pellets in je 200 µl FACS-Puffer. Die gefärbten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie gemessen und die Reinheit der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>dim/-</sup> Zellfraktion an der Gesamtheit der gemessenen Zellen bestimmt (vgl. Abbildung 8). Die Reinheit variierte zwischen 60,7 % und 86,5 % und betrug im Mittel 74,7 % (Standardabweichung=6,83 %, Median=70,9 %) (zur Durchflusszytometrie siehe auch Kapitel 3.2.11).



**Abbildung 8:** Darstellung der Reinheitsmessung der Treg-Isolierung (=Treg-Purity, hier bei 81,4 % der CD4<sup>+</sup>-Zellen)

### 3.2.9 In vitro Kultur der Tregs und Treg-Charakterisierung

Um den Einfluss von unterschiedlichen Stimuli, insbesondere von IL-17A auf den Phänotyp und die funktionalen Eigenschaften der Tregs zu untersuchen, wurde mit den isolierten Tregs eine in vitro Kultur angelegt. Hierfür wurden die durch das MACS-Verfahren gewonnenen Zellen zunächst bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 300 µl Nährmedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde anschließend gleichmäßig auf 6 Wells einer 96er U-Bottom-Zellkulturplatte aufgeteilt. T-Zellen an sich benötigen für ihre Aktivierung und Expansion in vitro zusätzliche Signale, nämlich zum einen die Stimulation des CD3/TCR-Komplexes, welche die initiale Aktivierung der Zellen startet, und zum anderen eine Co-Stimulation, beispielsweise in Form von einer CD28-Aktivierung für eine erfolgreiche Proliferation. Um einen Einfluss der anschließend zugefügten Zytokinstimuli auf die Zellen überhaupt untersuchen zu können, benötigt es daher zunächst solche zusätzlichen Signale. Darum wurden

die Zellen, abgesehen von einer Negativkontrolle, immer mit anti-CD3 (Konzentration 1 µg/ml) und anti-CD28 (Konzentration 0,5 µg/ml) stimuliert. Additiv zu diesen Wachstumsstimuli wurden diverse Stimulantien verwendet, welche auf der einen Seite ein proinflammatorisches Milieu (IL-17A, Th17-Polarisationscocktail), auf der anderen Seite ein antiinflammatorisches Milieu (anti-IL-17A, Secukinumab) simulieren sollten. Aufgefüllt wurden die Wells mit Nährmedium jeweils auf 200 µl Gesamtvolumen. Mittels bereits im Labor durchgeführter Vorversuche wurden geeignete Konzentrationen und Inkubationszeiten ermittelt, die eine möglichst gute Proliferations- und Überlebensrate der Zellen ermöglichen. In Tabelle 15 sind die einzelnen Reagenzien in ihren Konzentrationen in den jeweiligen Wells dargestellt. Die Konzentrationen wurden in Pilotexperimenten ermittelt. Die Zellkultur aus Tregs und Stimulantien wurde für 5 Tage in einem Inkubationsschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Da die lange Inkubationszeit im Brutschrank nicht nur ein leichtes Wachstum von Zellen, sondern auch von Pilzen und Bakterien ermöglicht, ist ein steriles Ansetzen der Kultur sehr wichtig.

**Tabelle 15: Stimulantien und deren Konzentrationen für die Zellkultur**

Stimulus	Reagenz	Endkonzentration
<b>Negativkontrolle</b>	-	-
<b>Positivkontrolle</b>	Anti-CD3	1 µg/ml
	Anti-CD28	0,5 µg/ml
<b>IL-17A</b>	Interleukin-17A	50 ng/ml
<b>Anti-IL-17A</b>	Anti-Interleukin 17A	10 µg/ml
<b>Th17-Polarisationscocktail</b>	IL-1β	10 ng/ml
	IL-6	20 ng/ml
	IL-23	10 µg/ml
	TGFβ	5 ng/ml
<b>Medikament</b>	Secukinumab	10 µg/ml

Nach 5 Tagen wurde die Kultur aus dem Brutschrank entnommen, unter dem Mikroskop auf Proliferationsstatus und eventuelle Kontamination kontrolliert und je 100 µl der Überstände abgenommen, in 0,5 ml Reagiergefäße überführt und für spätere Versuche der Arbeitsgruppe bei -28 °C eingefroren. Die verbleibenden 100 µl Zellsuspensionen wurden stimuliert und durchflusszytometrisch auf Zellviabilität (Zombie-Färbung) und charakteristische Oberflächenmoleküle für Tregs (CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD127<sup>-</sup>), sowie deren wichtigen Transkriptionsfaktor FoxP3 und außerdem auf Th17-Zell-typische Eigenschaften,



wie etwa den Chemokinrezeptor CCR6 und das Zytokin IL-17 sowie auf das inflammatorische Zytokin IFN $\gamma$  untersucht. Hierdurch sollte eine mögliche Polarisierung der isolierten Tregs durch die verschiedenen Stimuli hin zu einem eher proinflammatorischen Phänotyp untersucht werden. In Tabelle 16 ist das verwendete Färbepanel der Treg-Charakterisierung dargestellt.

**Tabelle 16: Färbepanel der Treg-Charakterisierung**

Farbe/ Kanal	APC	APC/ Cy7	BD Horizon 500	BV421	FITC	PE	PE/Cy 7	PerCP/ Cy5.5
<b>Antikörper</b>	CD4	CD127	Zombie	<i>IL-17A</i>	<i>IFN<math>\gamma</math></i>	<i>FoxP3</i>	CD25	CCR6

Darstellung der Oberflächen- und *intrazellulären* Färbung

### 3.2.10 PBMC-Charakterisierung

Um eine bessere Vergleichbarkeit der Ausgangssituation im Lymphozytenpool zwischen gesunden und erkrankten Probanden zu ermöglichen und gegebenenfalls vorhandene Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen zu erfassen, wurde eine PBMC-Charakterisierung durchgeführt und somit *ex vivo* die PBMCs der Probanden analysiert. Hierfür wurden bei insgesamt 15 Probanden (5 gesunde Probanden sowie aus der JIA-Gruppe 5 extendend Oligoarthritis, 3 undifferenzierte Arthritis und 2 Enthesitis-assoziierte JIA Probanden) durchflusszytometrische Analysen an den zuvor mittels der Dichtegradientenzentrifugation isolierten PBMCs durchgeführt. Die aufgetauten Zellen wurden zunächst in der Neubauer-Zählkammer gezählt, durch Filterröhrchen pipettiert, in 7 gleich große Populationen aufgeteilt und anschließend stimuliert (abgesehen von Well 6), in FACS-Tubes überführt, gefärbt und mittels Durchflusszytometer gemessen. Das hierzu verwendete Färbepanel ist in Tabelle 17 schematisch dargestellt.

**Tabelle 17: Färbepanel der PBMC-Charakterisierung**

Farbe/ Kanal	Alexa Fluor	APC	BD Horizon 500	BV421	FITC	PE	PE/ Cy7	PerCP/ Cy5.5
<b>Panel 1 (Negativ- kontrolle)</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Panel 2 (Th1/Th17- Balance)</b>	CD4 (APC/ Fire)	CD161	Zombie	<i>IL-17A</i>	<i>TNF<math>\alpha</math></i>	<i>IFN<math>\gamma</math></i>	CD8	CCR6
<b>Panel 3 (Allgemeiner T-Zellpool)</b>	CCR7 (APC/ Cy7)	CCR6	Zombie	CD4	CD45RA	CXCR3	CD27	CD8
<b>Panel 4 (Tregs)</b>	CD8 (APC/ H7)	<i>IL-10</i>	Zombie	CD127	CD4	<i>FoxP3</i>	CD25	CCR6
<b>Panel 5 (Zytotoxische T-Zellen)</b>	CCR7 (APC/ Cy7)	<i>GranzymB</i>	Zombie	CD4	CD45RA	<i>Perforin</i>	CD27	CD8
<b>Panel 6 (Zytotoxische T-Zellen, unstimuliert)</b>	CCR7 (APC/ Cy7)	<i>GranzymB</i>	Zombie	CD4	CD45RA	<i>Perforin</i>	CD27	CD8
<b>Panel 7 (Treg/Th17- Balance)</b>	CD127 (APC/ Cy7)	<i>ROR<math>\gamma</math>t</i>	Zombie	<i>IL-17A</i>	CD4	<i>FoxP3</i>	CD25	CCR6

Darstellung der Oberflächen- und *intrazellulären* Färbung

Im Ergebnis-/Diskussionsteil wird sich nicht mehr auf die Nummer des Panels, sondern auf die darunter in Klammern angegebene angestrebte Charakterisierung bezogen.

Panel 1 entspricht einer nichtgefärbten Negativkontrolle zum Abschätzen der Populationsgrenzen in der Durchflusszytometer-Auswertung.

Panel 2 ermöglicht vorrangig die Abgrenzung von Th1- (CD4<sup>+</sup>, IFN $\gamma$ - und TNF $\alpha$ -Produktion) zu Th17-Zellen (CD4<sup>+</sup>, CCR6<sup>+</sup>, CD161<sup>+</sup>, IL-17-Produktion) und kann gegebenenfalls vorhandene Th1/Th17-Mischtypen aufzeigen.

Panel 3 beschreibt den allgemeinen T-Zell-Lymphozytenpool anhand des Reifegrades und der Aktivierung sowie Migrationsfähigkeit der T-Zellen. CXCR3<sup>+</sup> Zellen besitzen eine erhöhte Bereitschaft zur Migration in Entzündungsgebiete oder werden als Th1-Zellen klassifiziert. Auch CCR6 korreliert mit der Migrationsfähigkeit von T-Zellen und ist ein Marker für Th17-Zellen. Weiterhin ermöglichen die Oberflächenmoleküle CD45RA und CD27 eine Unterscheidung der T-Zellen in Naive-Zellen (CD45RA<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>), Gedächtniszellen (CD45RA<sup>-</sup>, CD27<sup>+</sup>) (=Memoryzellen), Effektor-Zellen (CD45RA<sup>-</sup>, CD27<sup>-</sup>) und terminal differenzierten Gedächtniszellen (CD45RA<sup>+</sup>, CD27<sup>-</sup>) (=TEMRA). CCR7 selbst ermöglicht eine Differenzierung in eher zentrale, antigenunerfahrene Zellen (CCR7<sup>+</sup>) versus peripher aktive Zellen (CCR7<sup>-</sup>) [10].

Panel 4 dient der Differenzierung von Treg-Eigenschaften (CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD127<sup>-</sup>, IL-10-Produktion) gegenüber anderen Zellarten. Die CCR6-Expression korreliert mit der Migrationsfähigkeit von T-Zellen und ist auch ein anerkannter Marker für Th17-Zellen.

Panel 5 charakterisiert die zytotoxischen Eigenschaften der Lymphozyten (Perforin, GranzymB) aufgeteilt nach Naiver-, TEMRA-, Effektor- und Memory-Fraktion.

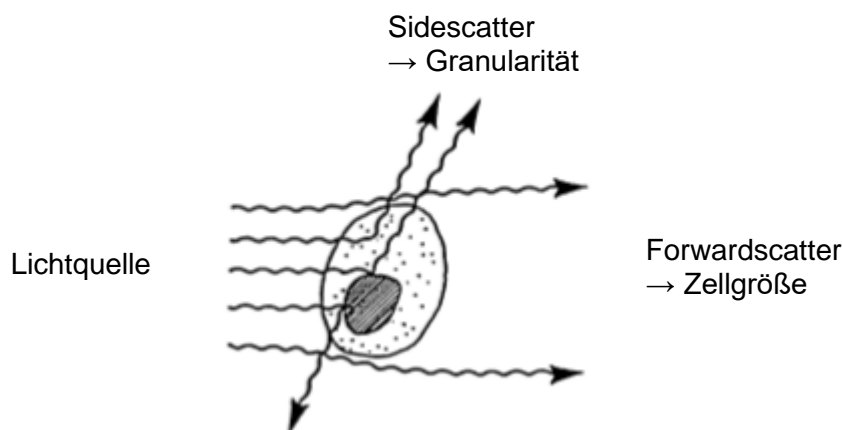
Panel 6 entspricht dem unstimulierten Panel 5 und soll untersuchen, ob die Stimulation der PBMCs einen Einfluss auf die normalerweise auch ohne Stimulation bereits vorhandenen zytotoxischen Parameter der Zellen nimmt und so eventuell relevante Ergebnisse verfälschen könnte.

Panel 7 untersucht die Treg/Th17-Balance und ermittelt das Vorliegen Th17-typischer Eigenschaften (vermehrte CCR6- und ROR $\gamma$ t-Expression, IL-17-Produktion) bei den Tregs und so eine mögliche Treg-Plastizität.

### **3.2.11 Durchflusszytometrie**

Sowohl zur Analyse des Lymphozytenpools als auch zur Messung des Einflusses verschiedener Stimuli auf Tregs wurde in dieser Arbeit die Durchflusszytometrie verwendet. Das Prinzip eines solchen Zytometers ist die Fluoreszenz-aktivierte

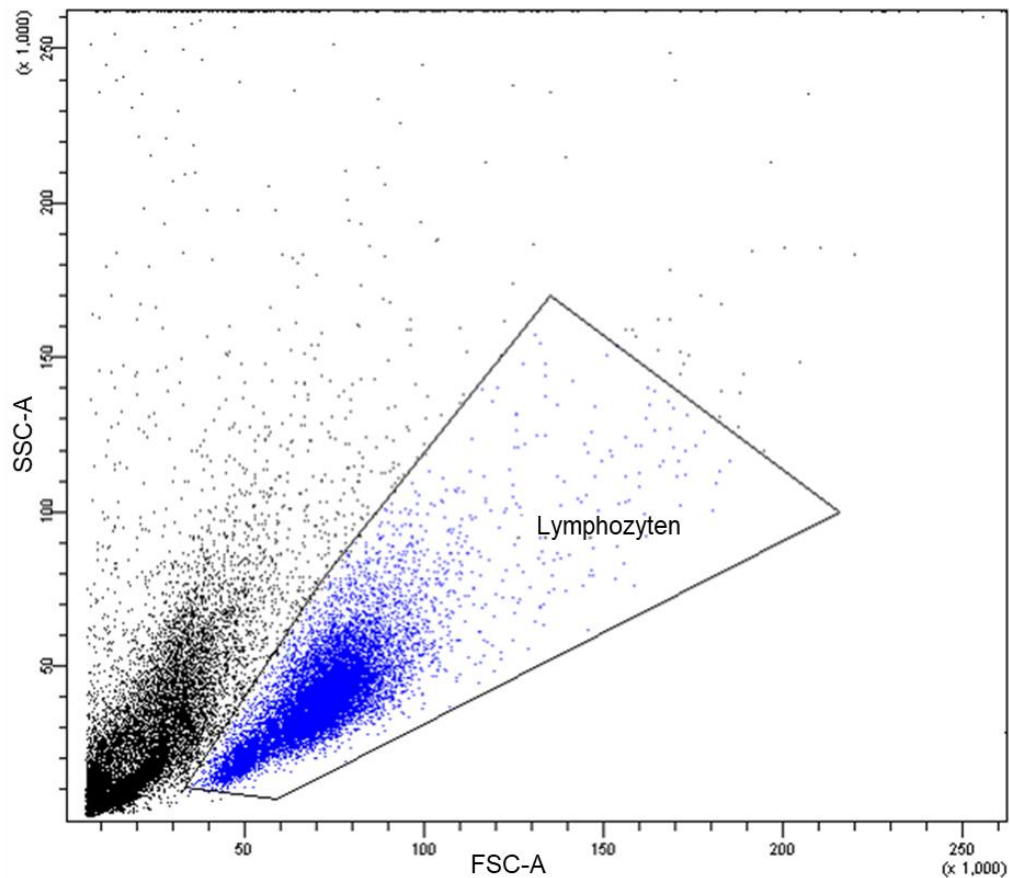
Zell-Sortierung. Die vorher verarbeitete und Fluoreszenz-markierte Probe wird durch Druck in das Zytometer eingesaugt. Durch das Fluidiksystem des Zytometers wird eine laminare Strömung erzeugt und die Zellen mithilfe sogenannter hydrodynamischer Fokussierung einzeln und zentral in Richtung Laser befördert [86]. Das BD FACS Canto II besitzt 3 verschiedenfarbige Laser, die monochromatisches Licht emittieren (blau, rot und violett). Sobald das Laserlicht auf eine Zelle trifft, wird es je nach Zelleigenschaft abgelenkt. Faktoren, die diese Streuung beeinflussen, sind zum einen die Zellgröße, welche eine Veränderung des Strahls in der Richtung des ursprünglichen Lasers bewirkt und durch eine Photodiode, den Forwardscatter (FCS), gemessen wird. Zum anderen wird das Licht durch die Zellgranularität nach seitwärts abgelenkt und dort in einem circa 90 ° Winkel von einer weiteren Photodiode, dem Sidescatter (SSC), detektiert (vgl. Abbildung 9).



**Abbildung 9: Darstellung des Laserungsverlaufs bei Auftreffen auf eine Zelle im Durchflusszytometer**

Das Licht wird bei Auftreffen auf die Zelle je nach Zellgröße und Granularität abgelenkt und von den Photodioden des Forward- bzw. Sidescatters registriert.  
Modifiziert nach [86].

Die Aufteilung im Sidescatter und Forwardscatter erlaubt eine Differenzierung unterschiedlicher Zellpopulationen und damit die Bestimmung der für diese Arbeit interessanten Lymphozyten [86] (vgl. Abbildung 10).



**Abbildung 10: Darstellung der Lymphozyten im Durchflusszytometer**

Mithilfe des Forward- (FSC) und Sidescatters (SSC) kann man die Lymphozyten von anderen Zellpopulationen, wie beispielsweise Granulozyten, differenzieren.

Um eine nähere Differenzierung der Lymphozyten zu erlangen, kann man die Zellen anfärben. Dies geschieht mithilfe verschiedener Antikörper, die an Oberflächen- oder intrazelluläre Strukturen der Zelle binden und die an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind. Die Fluorochrome besitzen ein jeweils spezifisches Absorptions- und Emissionsspektrum. Das bedeutet, dass je nach Wellenlänge des Lasers, der auf die markierte Zelle trifft, ein anderer Farbstoff angeregt wird und durch die Anregung selbst Licht emittiert. Dieses wird nach Durchtritt durch ein System von Spiegeln, Linsen und Filtern von Detektoren erfasst und sein Maximum ermöglicht einen genauen Rückschluss auf das

Fluorochrom. Die Intensität des Fluoreszenzsignals korreliert hierbei mit der Menge der durch das Fluorochrom angefärbten Strukturen. Dadurch kann ermittelt werden, welche der gemessenen Strukturen auf der Zelle vorhanden sind, die eben in den Laserstrahl befördert wird. Die Messung der kompletten Probe ermöglicht somit die Berechnung des prozentualen Anteils der einzelnen Subpopulationen an der Gesamtpopulation der Zellen. Da sämtliche Lichtsignale in elektrische Signale umgewandelt werden, können die Informationen über die Probe mithilfe einer Durchflusszytometer-Software beispielsweise in Punktdiagrammen (Dotplots) wiedergegeben werden [86].

Um verwertbare Messungen mittels Durchflusszytometrie durchführen zu können, musste die Probe zunächst bearbeitet werden. Vor der eigentlichen Färbung wurden die aufgetauten oder aus Kultur kommenden Zellen zuerst stimuliert. Hierfür wurde PMA verwendet, ein Aktivator der Proteinkinase C, welcher über nachfolgende Signalwege zu einer T-Zell-Aktivierung und leichter IL-2-Produktion führt [87]. Des Weiteren wurde Ionomycin hinzugefügt, welches zum einen durch Calcium-Einstrom aktivierte Signalwege, zum anderen durch eine mit PMA synergistische Wirkung auf die Proteinkinase C eine Aktivierung ruhender T-Zellen bewirkt [88]. Durch diese Stimulation werden die T-Zellen zur Zytokinproduktion angeregt. Da die Durchflusszytometrie (nicht wie beispielsweise der ELISA, welcher die Zytokine im Kulturmilieu misst) die neu produzierten Zytokine aus dem Inneren der Zellen misst, ist es nötig, die stimulierten Zellen an einer Zytokinsekretion nach extrazellulär zu hindern. Dies wurde durch die Addition von Brefeldin A bewirkt. Es interferiert mit der Transportfunktion des Golgi-Apparats sowie der Vesikelbildung [89] und fördert den retrograden Transport von Proteinen in Richtung Endoplasmatisches Retikulum. Hierbei wird lediglich die Sekretion der Proteine verhindert, nicht jedoch ihre Bildung [90]. Somit akkumulieren neu gebildete Proteine im Intrazellulärraum der Zelle und können mit der Durchflusszytometer-Methode gemessen werden. In Tabelle 18 sind die genannten Stimulantien/Reagenzien und die verwendeten Konzentrationen zusammengefasst. Im Anschluss an eine vierstündige Inkubation der Zellen mit dem Stimulationscocktail im Brutschrank wurden die Zellen wie folgt gefärbt.

**Tabelle 18: T-Zell-Stimulation vor Zellfärbung**

Stimulus/Reagenz	Konzentration
PMA	30 ng/ml
Ionomycin	1 µg/ml
Brefeldin A	5 µg/ml

### 3.2.11.1 Oberflächenfärbung

Für die Markierung der Oberflächenmoleküle wurden die stimulierten Zellen nach 4 h Inkubationszeit aus ihren Wells in FACS-Tubes pipettiert. Da nun die Zellen nicht mehr über einen längeren Zeitraum inkubiert wurden, konnten die folgenden Schritte außerhalb der Laminar Flow Hood erfolgen. Die Zellen wurden mit je 1 ml PBS gewaschen und 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde nach Absaugen des Überstandes mit 50 µl eines Antikörper-Mastermixes (je nach Antikörper 0,3 bzw. 0,5 µl Antikörper pro zu färbender Probe in PBS) und 50 µl einer Zombiesuspension (1:500 Verdünnung in PBS) gefärbt, gevortext und für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Den Negativkontrollen wurden hierbei statt des Mastermixes und der Zombiesuspension 100 µl PBS zugeführt. Im Anschluss an die Inkubationszeit erfolgte ein Waschschrift mit je 1 ml PBS über 5 min bei 1500 rpm, um ungebundene Antikörper aus den Proben zu entfernen. Die Zellen wurden anschließend in je 200 µl Fix/Perm-Puffer resuspendiert und für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Dieser Schritt diente der Fixation der Zellen mit der bisherigen Färbung und trug gleichzeitig zur Permeabilisierung der Zellmembran bei, welche eine essenzielle Voraussetzung für den nachfolgenden Schritt der intrazellulären Färbung darstellte.

### 3.2.11.2 Intrazelluläre Färbung

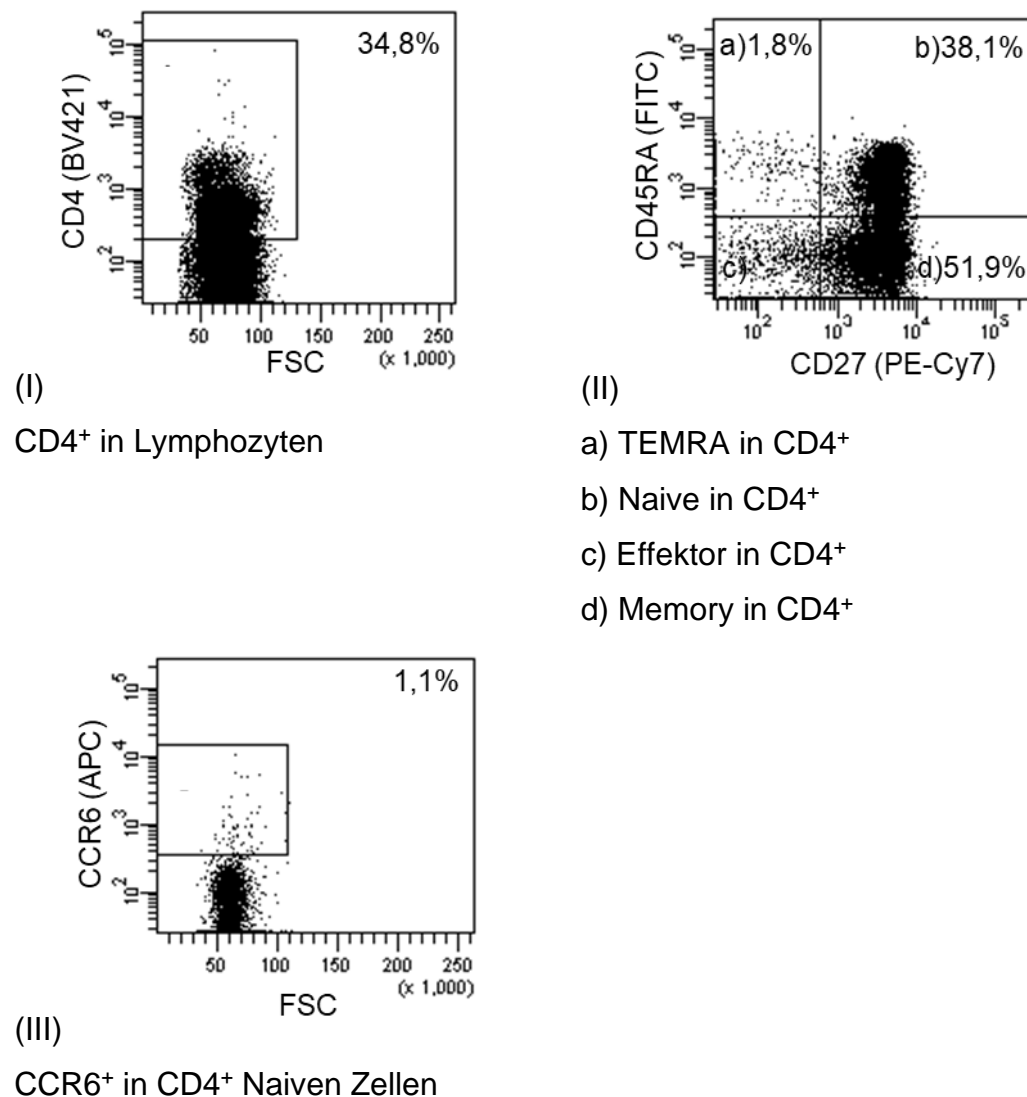
Nach der 30-minütigen Inkubationszeit mit dem Fix/Perm-Puffer wurden die Zellen mit 0,5 ml Perm/Wash-Puffer gemischt und für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Pellets in je 50 µl eines Intrazellulär-Antikörper-Mastermixes (je nach Antikörper 0,8 bzw. 1,2 µl Antikörper pro Probe in Perm/Wash-Puffer) resuspendiert, gevortext und für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Negativkontrolle wurde

ebenso behandelt, jedoch wurde hier statt des Mastermixes 50 µl des Perm/Wash-Puffers verwendet. Abschließend wurden die Proben nach der Inkubationszeit nochmals mit je 0,5 ml Perm/Wash-Puffer gewaschen, um nicht bindende Antikörper zu entfernen. Es wurde zu den verbleibenden Zellen je 200 µl FACS-Puffer hinzugegeben und die Zellsuspensionen gevortext. Die Zellproben konnten so bis zur durchflusszytometrischen Messung bei 4 °C gelagert werden.

### 3.2.11.3 *Auswertung mithilfe der FACS-Diva Software*

Für die Auswertung der durchflusszytometrischen Messung wurde die BD FACS Diva Software Version 6.1.3 verwendet. Bei der Färbung einer Probe mit einem Fluorochrom können die gemessenen Zellen in gefärbte und nicht gefärbte Anteile unterschieden werden. Somit können die Zellen je nach Oberflächenmolekülen oder produzierten Zytokinen durch das Setzen von Gates näher definiert und in Zellpopulationen subdifferenziert werden. Dieses Verfahren wurde standardmäßig bei den Treg- und PBMC-Charakterisierungen eingesetzt. Beispielhaft ist ein solches Gaten von Unterpulationen in Abbildung 11 dargestellt.





**Abbildung 11: Beispielhafte Darstellung des Gatens mittels FACS Diva Software**

PBMC-Charakterisierung im Färbepanel 3 der Kontrolle 4

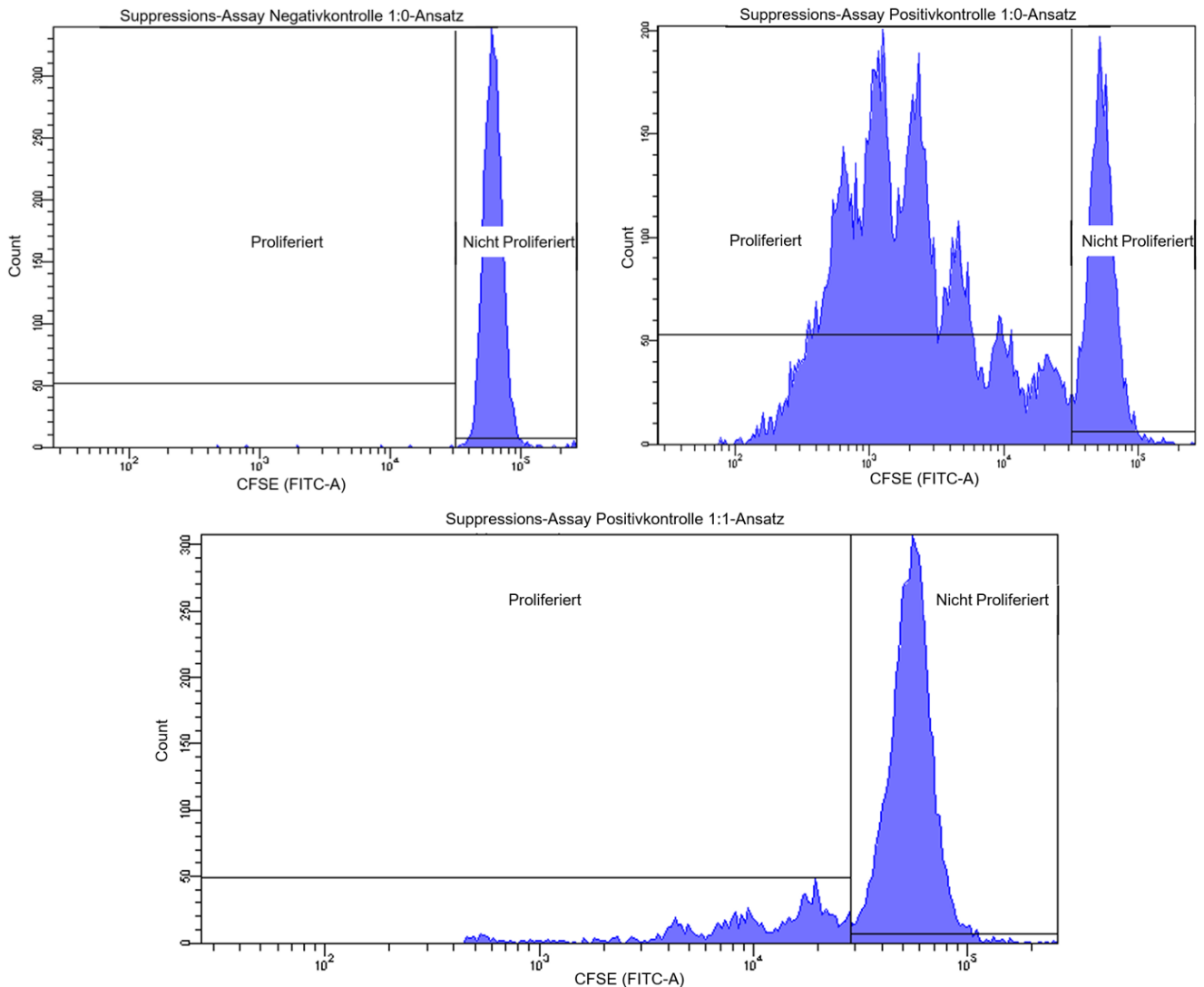
Zunächst wurde die CD4<sup>+</sup>-Population in allen Lymphozyten bestimmt (I), im Anschluss die Zellen dieser Population nach ihrer CD45RA- und CD27-Expression in TEMRA, Naive, Effektor und Memory-Zellen aufgeteilt (II). Danach wurde die CCR6-Expression der CD4<sup>+</sup> Naiven-Zellen bestimmt (III).

### 3.2.12 Suppressions-Assay

Um nicht nur den Einfluss der unterschiedlichen Stimuli auf den Phänotyp und die Zytokinproduktion der Tregs mittels Treg-Charakterisierung bestimmen zu können, sondern außerdem eine funktionale Analyse der Tregs in situ zu erstellen, wurde im Versuchsaufbau des Suppressions-Assays die Fähigkeit zur Suppression von Immunzellen näher ermittelt. Die isolierten Tregs wurden hierfür

mit der gleichen Menge PBMCs derselben Probe mit diversen Stimuli inkubiert und anschließend die Hemmung der Proliferation der PBMCs durch die Tregs durchflusszytometrisch gemessen.

Das Prinzip des hierfür verwendeten Carboxyfluoreszeindiacetat-Succinimidylester (=CFSE) -Assays beruht auf der Anfärbung derjenigen Zellen, deren Proliferation gemessen werden soll, nämlich der PBMCs. Hierfür wird das zunächst farblose Molekül CFSE mit den Zellen inkubiert. Dieses diffundiert nach intrazellulär und wird dort in ein fluoreszierendes Molekül umgewandelt. Nun kann es mittels Durchflusszytometrie gemessen werden. In den Zellen selbst geht das Fluoreszein eine stabile Bindung ein, welche auch über mehrere Tage Kultur aufrecht gehalten wird. Teilt sich jedoch eine Zelle, so teilt sich auch das intrazellulär befindliche Fluoreszein gleichmäßig auf die nachfolgenden beiden Tochterzellen auf, welche dann nur noch halb so viel Fluoreszein wie die Mutterzelle enthalten. Misst man nach einigen Tagen die Proliferation der Zellen mittels Durchflusszytometer-Analyse, so kann man ermitteln, wie viel Prozent der Zellen proliferiert haben, ja sogar zum Teil, wie häufig solche Teilungsschritte stattgefunden haben (vgl. Abbildung 12) [82].



**Abbildung 12: Negativ- und Positivkontrolle eines Suppressions-Assays im 1:0-Ansatz sowie Positivkontrolle im 1:1-Ansatz**

Oben: In diesen Durchflusszytometer-Plots sind CFSE-markierte PBMCs ohne Tregs nach 5 Tagen Kultur links im unstimulierten und rechts im anti-CD3/anti-CD28-Milieu dargestellt. Erkennbar ist die Anzahl der stark CFSE<sup>+</sup>-Zellen, welche den nicht proliferierten PBMCs entsprechen, im Vergleich zu jenen PBMCs, die CFSE verloren und somit bereits einen oder mehrere Teilungsschritte vollzogen haben.

Unten: In diesem Plot ist die Suppressionsfunktion der Tregs ersichtlich, die zu einer deutlichen Hemmung der Proliferation der PBMCs in der Cokultur mit Tregs geführt hat.

Um nicht nur die Proliferation der PBMCs messen zu können, sondern auch die Suppressionsfunktion der Tregs aus derselben Probe, wurde der PBMC-Kultur mit den diversen Stimuli die Co-Kultur (1:1) mit Tregs und den identischen Stimuli gegenübergestellt. So konnte ein Ausgangswert der Proliferation (1:0-Kultur) sowie die Reduktion der Proliferation (=Suppression) durch die Tregs (1:1-Kultur)

entnommen werden. Dies wurde in den unterschiedlichen Stimulationsgruppen wiederum verglichen.

Im Detail wurden dafür von den aufgetauten und gezählten PBMCs  $1 \times 10^6$  Zellen abgezweigt, die dafür verwendete Nährmediummenge auf 1 ml Nährmedium aufgefüllt und diese Zellsuspension im Brutschrank aufbewahrt, um ein Überleben der Zellen zu ermöglichen.

Mit den übrigen PBMCs wurde eine Treg-Isolierung wie in Kapitel 3.2.9 beschrieben durchgeführt. Nach Bestimmung der Anzahl der Tregs und der Messung ihrer Reinheit wurden die suspendierten Zellen 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in 300  $\mu$ l Nährmedium gut resuspendiert. Es folgte eine gleichmäßige Aufteilung der Tregs in 6 Wells einer 96er U-Bottom-Zellkulturplatte durch Einpipettieren von je 50  $\mu$ l Zellsuspension pro Well.

Die vorher abgetrennten PBMCs wurden mit CFSE markiert. Hierfür wurde 1  $\mu$ l des 5 mM CFSE-Stocks in 3 ml sterilem PBS resuspendiert. Die PBMCs selbst wurden 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert und anschließend in 1 ml sterilem PBS zur Lösung gebracht. Daraufhin wurde 1 ml der CFSE-Lösung mit dem 1 ml der PBMC-Lösung gemischt und die Suspension bei Raumtemperatur im Dunkeln für 5 min inkubiert. Die CFSE-Reaktion wurde anschließend mit 5 ml Nährmedium gestoppt, die Zellen erneut 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert und nach Absaugen des Überstandes mit einer definierten Menge an Nährmedium gemischt. Diese Nährmediummenge war abhängig von der zuvor bestimmten Anzahl der Tregs pro Well. Am Ende sollte ein 1:1-Verhältnis resultieren, d.h. es sollten in den entsprechenden Wells ebenso viele Tregs wie PBMCs vorliegen.

Die Assay-Kultur wurde abschließend wie in Tabelle 19 abgebildet angesetzt:

**Tabelle 19: Suppressions-Assay-Ansatz**

<b>Ansatz/Stimulus</b>	<b>PBMCs 1:0 Tregs</b>	<b>PBMCs 1:1 Tregs</b>
<b>Negativkontrolle</b>	50 $\mu$ l PBMCs, 150 $\mu$ l Nährmedium	50 $\mu$ l PBMCs, 50 $\mu$ l Tregs, 100 $\mu$ l Nährmedium
<b>Positivkontrolle (anti-CD3/anti-CD28)</b>	50 $\mu$ l PBMCs, 50 $\mu$ l Nährmedium, 100 $\mu$ l Stimulus	50 $\mu$ l PBMCs, 50 $\mu$ l Tregs, 100 $\mu$ l Stimulus

<b>Ansatz/Stimulus</b>	<b>PBMCs 1:0 Tregs</b>	<b>PBMCs 1:1 Tregs</b>
<b>IL-17A</b>	50 µl PBMCs, 50 µl Nährmedium, 100 µl Stimulus	50 µl PBMCs, 50 µl Tregs, 100 µl Stimulus
<b>Anti-IL-17A</b>	50 µl PBMCs, 50 µl Nährmedium, 100 µl Stimulus	50 µl PBMCs, 50 µl Tregs, 100 µl Stimulus
<b>Th17-Cocktail</b>	50 µl PBMCs, 50 µl Nährmedium, 100 µl Stimulus	50 µl PBMCs, 50 µl Tregs, 100 µl Stimulus
<b>Medikament</b>	50 µl PBMCs, 50 µl Nährmedium, 100 µl Stimulus	50 µl PBMCs, 50 µl Tregs, 100 µl Stimulus

Für die Stimuli wurden dieselben Konzentrationen verwendet wie bereits in der Treg-Kultur (vgl. Kapitel 3.2.9) beschrieben. Ebenso wurde die Kultur für 5 Tage bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> bebrütet. Da die Zellen sehr empfindlich für Kontaminationen sind, ist auch beim Ansetzen des Suppressions-Assays auf Sterilität bei allen Arbeitsschritten zu achten.

Nach 5 Tagen wurden die einzelnen Proben mithilfe der Durchflusszytometrie gemessen und ausgewertet.

Um die Suppressionsfunktion der Tregs je nach Kulturmilieu zu ermitteln, wurden die Kulturansätze PBMC 1:0 Tregs und PBMC 1:1 Tregs gegenübergestellt und die Inhibition in % wie folgt berechnet:

$$\text{Inhibition in \%} = 1 - \frac{\text{Proliferation PBMC unter Treg Einfluss} \times 100}{\text{Proliferation PBMC}}$$

### **3.2.13 Statistische Auswertung**

Die als explorative Studie angelegte Arbeit wurde statistisch mithilfe der SPSS-Software IBM SPSS Statistics 24 (IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland) ausgewertet, die graphische Darstellung erfolgte mittels GraphPad PRISM 6 (GraphPad Software, Inc.). Nach Überprüfung auf Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilks-Test wurden die überwiegend nicht-parametrischen kontinuierlichen, sowie nicht-verbundenen Variablen mit dem hierfür geeigneten Mann-Whitney-U-Test ausgewertet. Auf eine Korrektur des Typ I Fehlers durch multiples Testen wurde aufgrund des explorativen Charakters der Studie bei der PBMC-Charakterisierung verzichtet. Zur Betrachtung der confirmatorischen

Fragestellung auf den Hauptzielparameter der Stimulationsversuche mit Polarisierbarkeit und Suppressionsfähigkeit wurde zusätzlich die Bonferroni-Korrektur mit jeweils entsprechender Anpassung des Signifikanzniveaus angewandt. Zur Signifikanzangabe wurde die berechnete exakte Signifikanz nach Mann-Whitney-U-Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt.

## **4 Ergebnisse**

Dieses Kapitel gliedert sich in die Unterbereiche der relevanten Vorversuche, der Treg-Charakterisierung und PBMC-Charakterisierung sowie der Suppressions-Assays.

### **4.1 Relevante Vorversuche vor Durchführung der Kulturversuche**

Vor Durchführung der Treg-Charakterisierungen und der Suppressions-Assays wurden, abgesehen von bereits durch die Arbeitsgruppe durchgeführten Versuchen zu optimaler Kulturbedingung wie Kulturzeitraum und Reagenzienkonzentrationen, ebenfalls Versuche zur Prestimulation der Tregs und optimaler Stimulation der PBMCs durchgeführt. Der Aufbau und insbesondere die entsprechenden Ergebnisse dieser Versuche werden im Folgenden beschrieben.

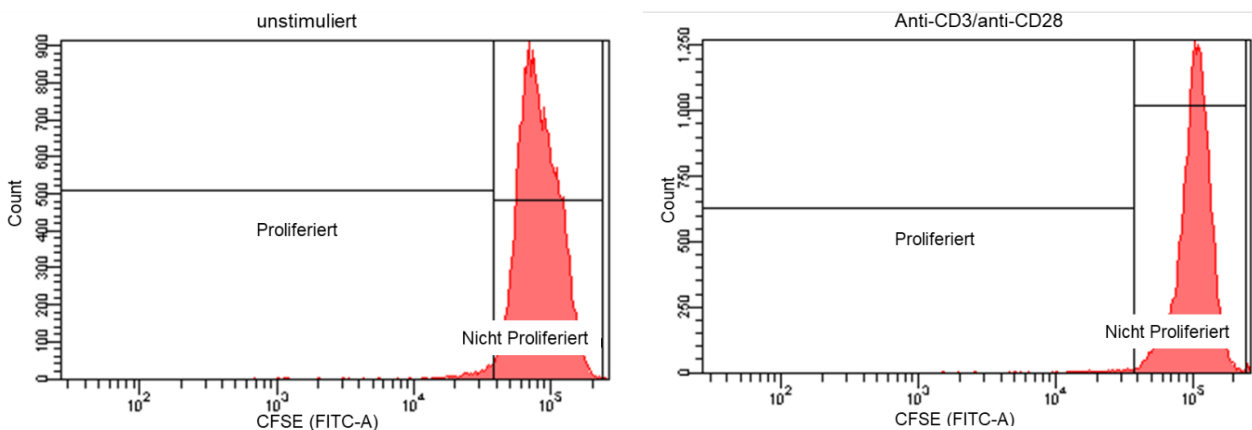
#### **4.1.1 Prestimulationsversuch der Tregs**

Da im Hinblick auf die Fragestellung eine Veränderung der Treg-Funktion im Suppressions-Assay nach bereits erfolgter Kultur mit den Stimulantien interessant erscheint, wurden 4 Vorversuche durchgeführt, die die Aussagekraft einer vorherigen Stimulation ermitteln sollten. Aufgrund der möglichst gleichen Bedingungen für Tregs und PBMCs innerhalb der Suppressions-Assays sollte bei einer Prestimulation die gesamte Kultur stimuliert werden, weshalb bei den Vorversuchen beispielhaft zunächst nur mit den PBMCs gearbeitet wurde.

Zum einen wurden PBMCs nach 3-tägiger Stimulation mit anti-CD3 bzw. mit anti-CD3/anti-CD28 mit CFSE markiert und anschließend für 5 Tage mit Tregs kultiviert. Hierbei konnte keinerlei Proliferation der PBMCs und dadurch auch keine Suppression durch die Tregs nachgewiesen werden.

Zum anderen wurden die PBMCs nach 3-tägiger Stimulation mit anti-CD3 bzw. anti-CD3/anti-CD28 für 3 weitere Tage lediglich mit Nährmedium inkubiert und

somit eine „Ruhephase“ nachgeahmt. Im Anschluss erfolgten eine CFSE-Markierung und erneute Stimulation über 3 Tage. Auch hier konnte keinerlei Proliferation der PBMCs mittels CFSE-Markierung nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 13). In einem weiteren Versuch wurde getestet, ob eine Proliferation nachweisbar ist, wenn man die CFSE-Markierung an den Beginn der Versuchsreihe setzt. Jedoch war auch hier nach dem Stimulation-Ruhe-Stimulations-Zyklus keine Proliferation mehr nachweisbar.



**Abbildung 13: Fehlende Proliferation der PBMCs im Prestimulationsversuch**

In der Positivkontrolle mit anti-CD3/anti-CD28 (rechts) konnte nach einem Zyklus aus Stimulation-Ruhephase-Stimulation kein Unterschied im CFSE-Färbungsverhalten der PBMCs zur Negativkontrolle (links) mehr festgestellt werden.

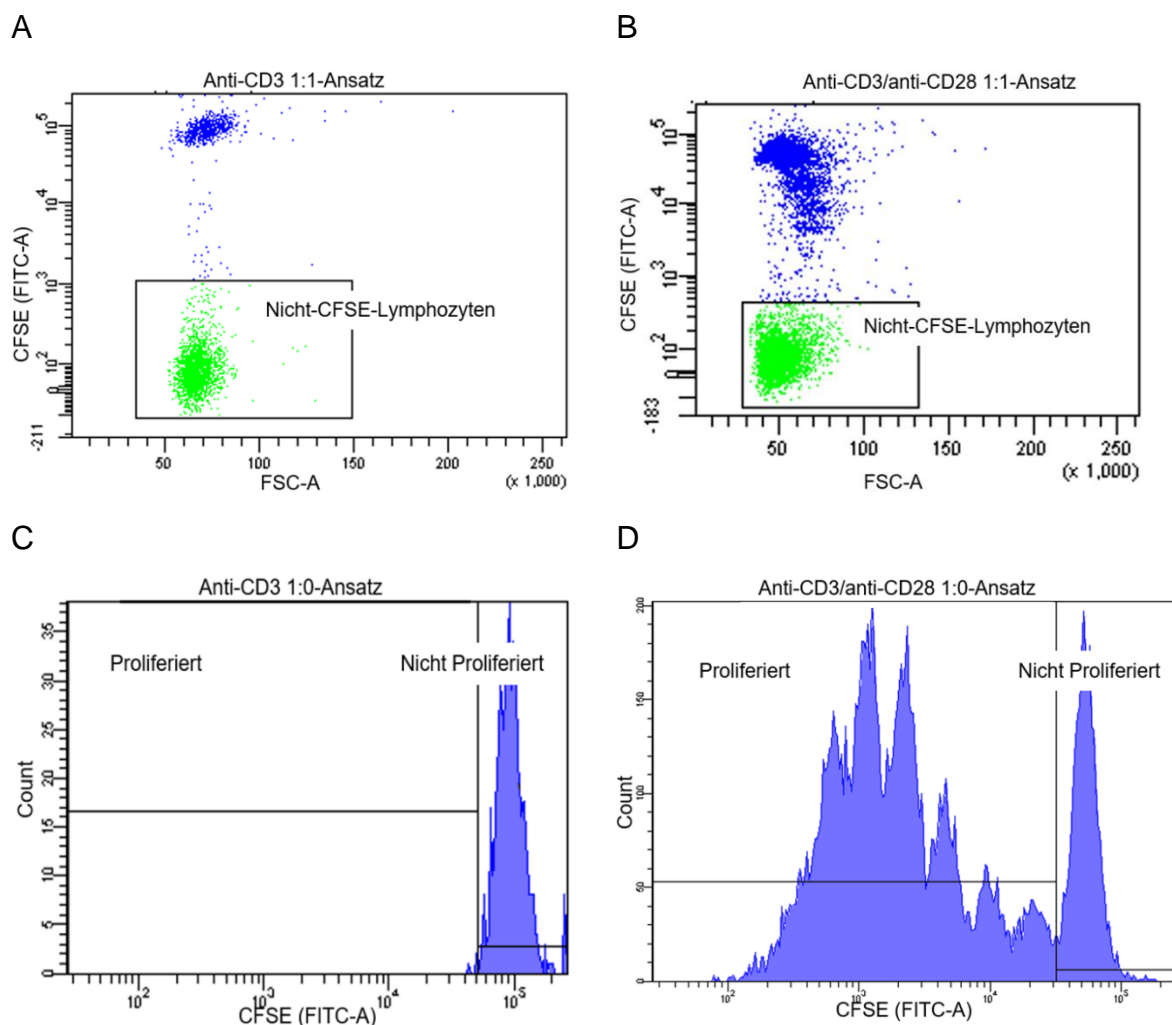
Als Schlussfolgerung wurden daher sämtliche Versuche mit unbehandelten „natürlichen“ Zellen durchgeführt, um eine möglichst zuverlässige Aussagekraft der Suppressions-Assays und im Zuge des ähnlichen Versuchsdesigns auch der Treg-Charakterisierungen zu ermöglichen.

#### 4.1.2 Ermittlung der optimalen Zellstimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 für die Suppressions-Assays

Da bekannt ist, dass anti-CD28 als Co-Stimulus aller T-Zellen auch aktivierend und proliferativ auf Tregs wirkt [91, 92], wurden zunächst einige Proliferations- und Suppressions-Assays (n=3) lediglich mit anti-CD3-Stimulation durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass diese Art der Stimulation eine bessere Abgrenzung der zugefügten Tregs von den PBMCs ermöglichte, da diese deutlich als CFSE<sup>-</sup> zu erkennen waren und als kleine Population auch nicht während der



Inkubationszeit proliferierten (vgl. Abbildung 14, A). Jedoch führte der Mangel an Co-Stimulation gleichzeitig zu einer beinahe nicht vorhandenen PBMC-Proliferation (vgl. Abbildung 14, C), was eine Auswertung der Suppression durch die Tregs unmöglich machte. Im Gegensatz dazu folgte auf die kombinierte anti-CD3 und anti-CD28-Stimulation eine effektive PBMC-Proliferation (vgl. Abbildung 14, D). Trotz etwas vergrößerter Treg-Populationen (entsprach in etwa der CFSE-Lymphozytenpopulation) war noch eine Abgrenzung von den wenig CFSE-markierten und daher proliferierten PBMCs möglich (vgl. Abbildung 14, C), weshalb in den folgenden Suppressions-Assays dieses Stimulationsschema verwendet wurde.



**Abbildung 14: Positivkontrollen des Suppressions-Assays mit anti-CD3 (A und C) sowie mit anti-CD3/anti-CD28 (B und D)**

Abbildungen A und B zeigen vergleichend die Abgrenzbarkeit der CFSE<sup>-</sup>-Lymphozyten (entsprechen den Tregs im 1:1-Ansatz) von stark/gemindert CFSE<sup>+</sup>-Lymphozyten. Abbildungen C und D zeigen vergleichend die Proliferation der PBMCs im 1:0-Ansatz.

## 4.2 Probandencharakterisierung

Von den 16 rekrutierten JIA-Patienten waren 9 Patienten als extendend Oligoarthritis (eOA), 1 als persistierende Oligoarthritis (pOA), 1 als seronegative Polyarthritis (RF<sup>-</sup> P), 3 als undifferenzierte Arthritis (UD) und 2 als EAA klassifiziert. Die Patienten zeigten sich unter Medikation in laborchemischer Remission (jeweils 2 Patienten mit lediglich leicht erhöhten Entzündungsparametern) sowie klinisch mit geringer Krankheitsaktivität (lediglich 4 Patienten mit aktiven Gelenken; in diesen 4 Fällen waren 1, 3, 3 oder

4 Gelenke betroffen). Die demographischen Merkmale der Patienten und Kontrollen sind in Tabelle 20, die klinischen Daten der Patienten in Tabelle 21 abgebildet.

**Tabelle 20: Demographische Daten der Studienpopulation**

	<b>JIA gesamt</b>	<b>eOA</b>	<b>pOA</b>	<b>RF- P</b>	<b>UD</b>	<b>EAA</b>	<b>HC</b>
<b>Anzahl</b>	16	9	1	1	3	2	10
<b>Anzahl männlich (%)/ weiblich (%)</b>	8 (50%)/ 8 (50%)	3 (33,3%)/ 6 (66,7%)	1 (100%)/ 0 (0%)	0 (0%)/ 1 (100%)	2 (66,7%)/ 1 (33,3%)	2 (100%)/ 0 (0%)	2 (20%)/ 8 (80%)
<b>Alter in Jahren zum Einschluss- zeitpunkt</b>	15,6 ± 4,8 (15,5; 8- 27)	16,6 ± 5,6 (17; 8-27)	10	21	15 ± 1,4 (16; 13-16)	12,5 ± 0,5 (12,5; 12- 13)	23,4 ± 1,7 (23,5; 19- 25)
<b>Alter in Jahren zum Diagnose- zeitpunkt</b>	5,5 ± 4,1 (4; 1-15)	3,7 ± 2,4 (3; 1-10)	4	5	9,3 ± 6,0 (12; 1-15)	9 ± 1 (9; 8-10)	-
<b>Krankheits- dauer in Jahren</b>	10,1 ± 6,2 (11; 1-24)	12,9 ± 5,6 (13; 4-24)	6	16	5,7 ± 4,6 (4; 1-12)	3,5 ± 1,5 (3,5; 2-5)	-

Angaben in absoluten Zahlen/Prozentzahlen oder als Mittelwert ± Standardabweichung (Median; Minimum-Maximum), JIA = juvenile idiopathische Arthritis, eOA = extended Oligoarthritis, pOA = persistierende Oligoarthritis, RF- P = seronegative Polyarthritis, DU = undifferenzierte Arthritis, EAA = Enthesitis-assoziierte Arthritis, HC = Healthy Control.

Tabelle 21: Klinische Daten der JIA-Patienten

JIA gesamt		
<b>Medikation</b>	15/ 93,8%	
<b>Nichtsteroidale Antirheumatika<sup>a</sup></b>	8/ 50%	
<b>Methotrexat<sup>b</sup></b>	7/ 43,8%	
<b>Glukokortikoide<sup>c</sup></b>	2/ 12,5%	
<b>Biologika<sup>d</sup></b>	12/ 75%	
	Tocilizumab 1/ 6,3%	
	Adalimumab 4/ 25%	
	Abatacept 2/ 12,5%	
	Etanercept 5/ 31,3%	
<b>Mycophenolat-Mofetil<sup>e</sup></b>	2/ 12,5%	
<b>Sulfasalazin<sup>f</sup></b>	1/ 6,3%	
<b>Vitamin D Supplementation<sup>g</sup></b>	5/ 31,3%	
<b>ANA (antinuclear antibodies) positiv</b>	12/ 75%	
<b>RF positiv</b>	0/ 0%	
<b>HLA-B27 positiv</b>	3/ 18,8%	
<b>CRP (C-reactive protein) (mg/dl)</b>	0,14 ± 0,26 (0,01; 0-0,93)	
<b>BSG (Blutsenkungsgeschwindigkeit) (mm/h)</b>	11,4 ± 10,2 (6,5; 2-35)	
<b>Leukozyten x10<sup>3</sup> pro µl (Standard 4,8-10)</b>	6,6 ± 2,3 (6,4; 2,4-11,5)	
<b>Lymphozyten</b>	Absolut in G/l (Standard 1,2-3,4)	2,5 ± 0,8 (2,4; 1,3-4,3)
	Relativ in % (Standard 26-40%)	41,3 ± 11,1 (41,0; 13,8-64)
<b>Thrombozyten x10<sup>3</sup> pro µl (Standard 150-450)</b>	226,8 ± 54,3 (232; 138-327)	
<b>JADAS (Juvenile Arthritis Disease Activity Score)</b>	6,8 ± 5,3 (6; 0-17,2)	

Angaben in absoluten Zahlen und in Prozentzahlen (n/ %) oder als Mittelwert ± Standardabweichung (Median; Minimum-Maximum)

Medikamentendosen:

<sup>a</sup> Celecoxib 400mg/Tag (d) per os (p.o.), Ibuprofen 400-1200mg/d p.o., Naproxen 500-1000mg/d p.o., Diclofenac 25-30mg/d p.o.

<sup>b</sup> Methotrexat 12,5-25mg/Woche subkutan (s.c.) (gewichtsadaptiert ≤ 15mg/m<sup>2</sup>/Woche)

<sup>c</sup> Glukokortikoid retardiertes Prednison 5mg/d p.o., Prednisolon 15mg/d p.o.

<sup>d</sup> Biologika: Tocilizumab 480mg/4 Wochen intravenös, Adalimumab 20mg/2 Wochen s.c.-40mg/10d s.c., Abatacept 125mg/Woche s.c.-750mg/4 Wochen s.c., Etanercept 25mg/2 Wochen s.c.-50mg/Woche s.c.

<sup>e</sup> Mycophenolat-Mofetil 500-2000mg/d p.o.

<sup>f</sup> Sulfasalazin 1g/d p.o.

<sup>g</sup> Vitamin D 500IE/d-20000IE/2 Wochen p.o.

JADAS-Berechnung: Einschätzung Arzt (0-10) + Einschätzung Patient (0-10) + Anzahl aktiver Gelenke + (BSG-20/10)

### 4.3 PBMC-Charakterisierung

Das Kapitel der PBMC-Charakterisierungsergebnisse gliedert sich in eine Betrachtung der für diesen Versuchsteil verwendeten Proben und in eine genaue Analyse der Ergebnisse der einzelnen Färbepanels.

#### 4.3.1 Charakterisierung der Probandengruppen für die PBMC-Charakterisierung

Für die PBMC-Charakterisierung wurden die Proben von 10 Patienten und 5 gesunden Kontrollen verwendet. Die Proben wurden innerhalb der beiden Probandengruppen zufällig ausgewählt. Die demographische Beschreibung der beiden Kohorten ist in Tabelle 22 dargestellt.

**Tabelle 22: Demographische Beschreibung der Patienten (JIA)- und Kontrollkohorte (HC) der PBMC-Charakterisierung**

	JIA		HC		P-Wert
	N	Häufigkeit in %	N	Häufigkeit in %	
Männlich	7	70	1	20	
Weiblich	3	30	4	40	
	M ± SD	Median (Min.-Max.)	M ± SD	Median (Min.-Max.)	P-Wert
Alter (Jahre) bei Blutentnahme	15,6 ± 2,8	15,5 (12-20)	22,4 ± 2,0	23,0 (19-24)	<b>0,003</b>
Alter (Jahre) bei Diagnose	6,6 ± 5,0	6,0 (1-15)	-	-	-
Krankheitsdauer in Jahren	9,0 ± 5,5	11,0 (1-16)	-	-	-

M = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min. = Minimalwert; Max. = Maximalwert

##### 4.3.1.1 Charakterisierung der Patientenkohorte

Die Patientenkohorte gliederte sich in eine Kohorte mit 5 extended Oligoarthritis-Patienten, 3 Patienten mit undifferenzierter (HLA-B27 negativer) Arthritis und 2 EAA-Patienten. Da in Studien signifikante Unterschiede zwischen oligo-/polyartikulären JIA-Subtypen und EAA/sJIA-Patienten bezüglich der peripheren Lymphozytenverteilung festgestellt wurden, besteht die mit den gesunden Kontrollen verglichene JIA-Gruppe aus den 5 eOA und 3 UD-Patienten. Da die Probenzahl der EAA-Gruppe mit 2 als sehr niedrig eingestuft wird, werden diese

Proben lediglich deskriptiv beschrieben. Die demographische Beschreibung der beiden Kohorten der Patientengruppe ist in Tabelle 23 dargestellt.

**Tabelle 23: Demographische Beschreibung der mit den Kontrollen zu vergleichenden JIA- und der separierten EAA-Gruppe der PBMC-Charakterisierung**

	JIA		EAA	
	N	Häufigkeit in %	N	Häufigkeit in %
Männlich	5	62,5	2	100
Weiblich	3	37,5	0	0
	M ± SD	Median (Min.-Max.)	M ± SD	Median (Min.-Max.)
Alter (Jahre) bei Blutentnahme	16,4 ± 2,4	16 (13-20)	12,5 ± 0,5	12,5 (12-13)
Alter (Jahre) bei Diagnose	6,0 ± 3,5	3,5 (1-15)	9,0 ± 1	9,0 (8-10)
Krankheitsdauer in Jahren	10,4 ± 4,9	12,5 (1-16)	4,8 ± 4,3	3,5 (2-5)

JIA = juvenile idiopathische Arthritis, EAA = Enthesitis-assoziierte Arthritis, M = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min. = Minimalwert; Max. = Maximalwert

In der JIA-Gruppe erhielten 2 Patienten lediglich ein NSAR als Therapieschema. Die anderen 5 Patienten erhielten neben einer konventionellen synthetischen Basistherapie auch ein Biologikum. In der EAA-Gruppe erhielt ein Patient ein Biologikum, der andere eine kombinierte Basistherapie.

In der JIA-Gruppe waren 5 Patienten ANA positiv und 1 Patient HLA-B27 positiv. 1 Patient der EAA-Gruppe war ANA positiv und beide HLA-B27 positiv. Alle Patienten waren RF negativ.

Je 2 Patienten der JIA-Gruppe zeigten leichte CRP bzw. BSG-Erhöhungen, 1 Patient eine Leukozytose mit gleichzeitiger leichter relativer Lymphopenie, 4 Patienten eine absolute oder relative leichte Lymphozytose.

Beide EAA-Patienten hatten eine leichte relative Lymphozytose, wovon 1 Patient eine gleichzeitige Leukopenie hatte (vgl. Tabelle 24).

**Tabelle 24: Laborwerte der Patientenkohorte der PBMC-Charakterisierung**

Laborwert	Referenzbereich	JIA	EAA
		M ± SD (Median; Min.-Max.)	M ± SD (Median; Min.-Max.)
CRP (mg/dl)	<0,5	0,21 ± 0,33 (0,20; 0-0,93)	0,01 ± 0,01 (0,01; 0-0,02)
BSG (mm/h)	<15-20mm/h	11,8 ± 11,0 (6,5; 2-35)	9,5 ± 5,6 (9,5; 3,9-15)
Leukozyten/µl	4800-10000	7675 ± 1705,7 (7300; 5800-11500)	4150 ± 650 (4150; 3500-4800)
Lymphozyten absolut (G/l)	1,2-3,4	2,7 ± 0,7 (2,8; 1,6-3,7)	2,1 ± 0 (2,1; 2,1-2,1)
Lymphozyten relativ (%)	26-46	36 ± 10,0 (39,3; 13,8-45,5)	51,8 ± 8,6 (51,8; 43,2-60,3)
Thrombozyten/µl	150000-450000	248375 ± 45705,4 (240500; 172000-327000)	195000 ± 4000 (195000; 155000-235000)

JIA = juvenile idiopathische Arthritis, EAA = Enthesitis-assoziierte Arthritis, M = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min. = Minimalwert; Max. = Maximalwert

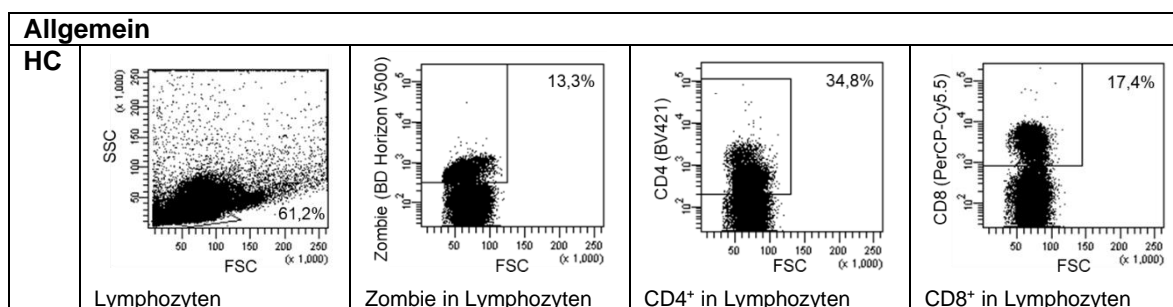
#### 4.3.2 Analyse des allgemeinen T-Zell-Lymphozytenpools

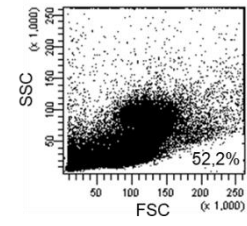
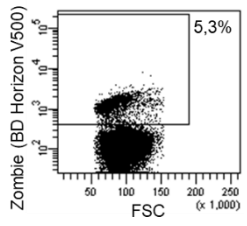
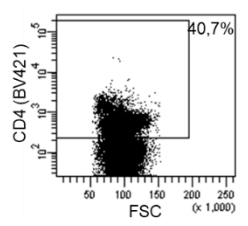
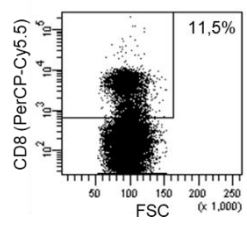
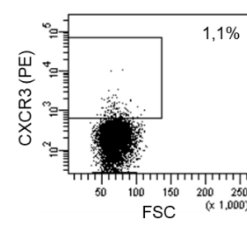
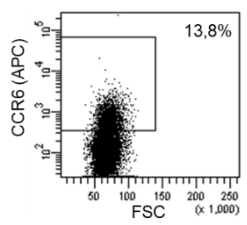
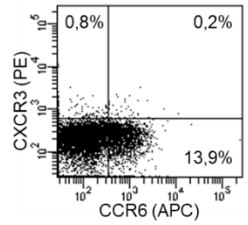
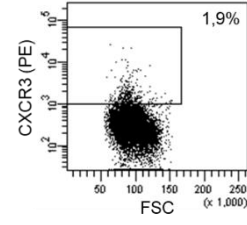
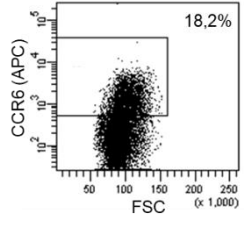
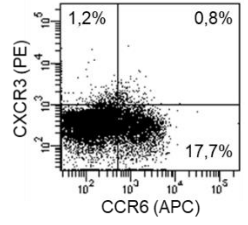
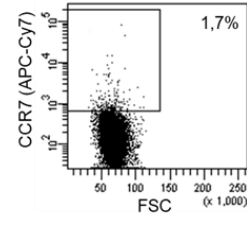
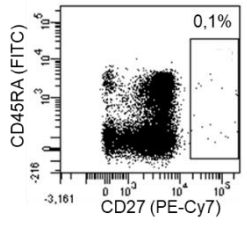
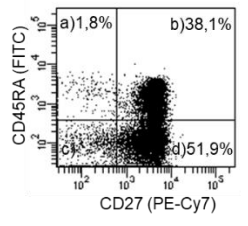
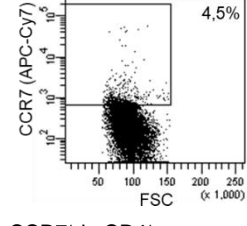
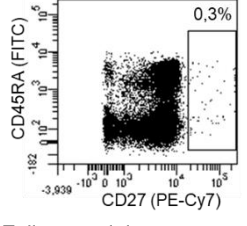
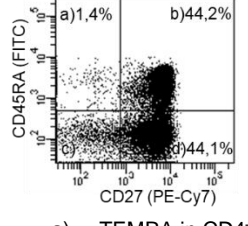
Das Panel zur Analyse des allgemeinen T-Zell-Lymphozytenpools ermöglichte die Darstellung des Reife- und Aktivitätsgrades der T-Lymphozyten sowie der Migrationsfähigkeit und erster Th1/Th17-Eigenschaften (vgl. auch Tabelle 1, Tabelle 2, Tabelle 25 sowie Abbildung 1), Diese Darstellung wird nachfolgend deskriptiv betrachtet und Unterschiede zwischen den Populationen analysiert. Zuvor ist in Tabelle 26 das Beispielgating für je eine gesunde Kontrolle und einen JIA-Patienten dargestellt.

**Tabelle 25: Reife- und Aktivitätsgrad der Lymphozyten**

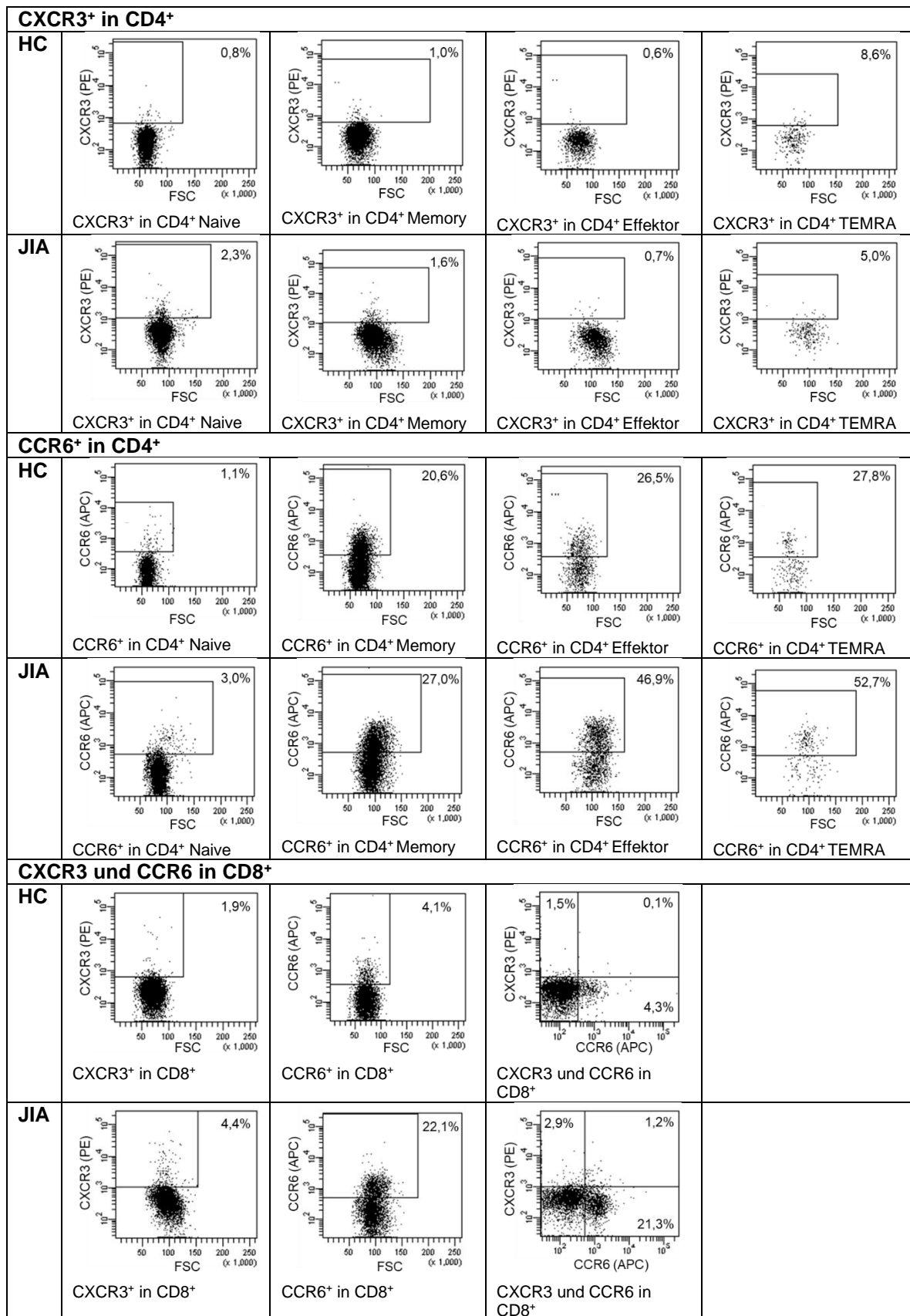
T-Zellpopulationen	CD45RA <sup>+</sup>	CD45RA <sup>-</sup>
CD27 <sup>+</sup>	Naive	Memory
CD27 <sup>-</sup>	TEMRA	Effektor

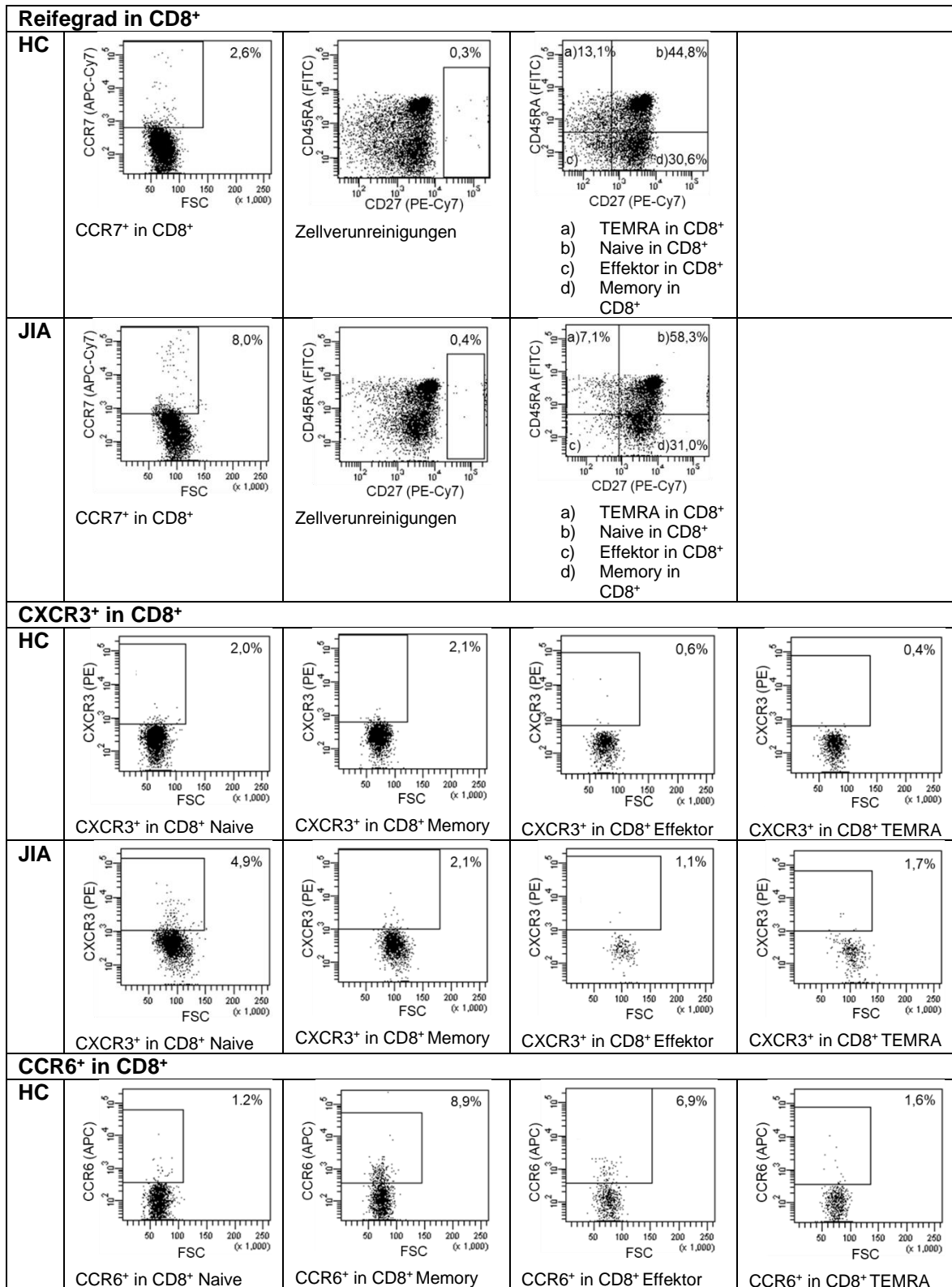
**Tabelle 26: PBMC-Charakterisierung des allgemeinen T-Zell-Lymphozytenpools einer gesunden Kontrolle (HC) und eines Patienten (JIA)**

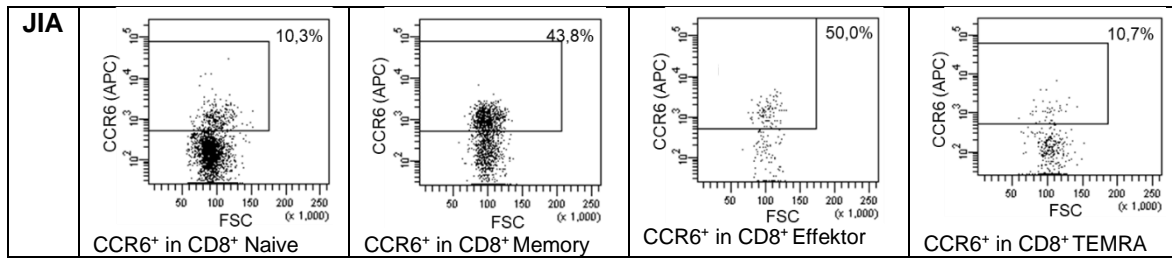


<b>JIA</b>	 <p>SSC (x 1,000) FSC (x 1,000) 52,2%</p> <p>Lymphozyten</p>	 <p>Zombie (BD Horizon V500) FSC (x 1,000) 5,3%</p> <p>Zombie in Lymphozyten</p>	 <p>CD4 (BV421) FSC (x 1,000) 40,7%</p> <p>CD4<sup>+</sup> in Lymphozyten</p>	 <p>CD8 (PerCP-Cy5.5) FSC (x 1,000) 11,5%</p> <p>CD8<sup>+</sup> in Lymphozyten</p>
<b>CXCR3 und CCR6 in CD4<sup>+</sup></b>				
<b>HC</b>	 <p>CXCR3 (PE) FSC (x 1,000) 1,1%</p> <p>CXCR3<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup></p>	 <p>CCR6 (APC) FSC (x 1,000) 13,8%</p> <p>CCR6<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup></p>	 <p>CXCR3 (PE) CCR6 (APC) 0,8% 0,2% 13,9%</p> <p>CXCR3 und CCR6 in CD4<sup>+</sup></p>	
<b>JIA</b>	 <p>CXCR3 (PE) FSC (x 1,000) 1,9%</p> <p>CXCR3<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup></p>	 <p>CCR6 (APC) FSC (x 1,000) 18,2%</p> <p>CCR6<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup></p>	 <p>CXCR3 (PE) CCR6 (APC) 1,2% 0,8% 17,7%</p> <p>CXCR3 und CCR6 in CD4<sup>+</sup></p>	
<b>Reifegrad in CD4<sup>+</sup></b>				
<b>HC</b>	 <p>CCR7 (APC-Cy7) FSC (x 1,000) 1,7%</p> <p>CCR7<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup></p>	 <p>CD45RA (FITC) CD27 (PE-Cy7) -216 -3,161 0,1%</p> <p>Zellverunreinigungen</p>	 <p>CD45RA (FITC) CD27 (PE-Cy7) a)1,8% b)38,1% c)51,9% d)1,9%</p> <p>a) TEMRA in CD4<sup>+</sup> b) Naive in CD4<sup>+</sup> c) Effektor in CD4<sup>+</sup> d) Memory in CD4<sup>+</sup></p>	
<b>JIA</b>	 <p>CCR7 (APC-Cy7) FSC (x 1,000) 4,5%</p> <p>CCR7<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup></p>	 <p>CD45RA (FITC) CD27 (PE-Cy7) -182 -3,939 0,3%</p> <p>Zellverunreinigungen</p>	 <p>CD45RA (FITC) CD27 (PE-Cy7) a)1,4% b)44,2% c)44,1% d)1,4%</p> <p>a) TEMRA in CD4<sup>+</sup> b) Naive in CD4<sup>+</sup> c) Effektor in CD4<sup>+</sup> d) Memory in CD4<sup>+</sup></p>	









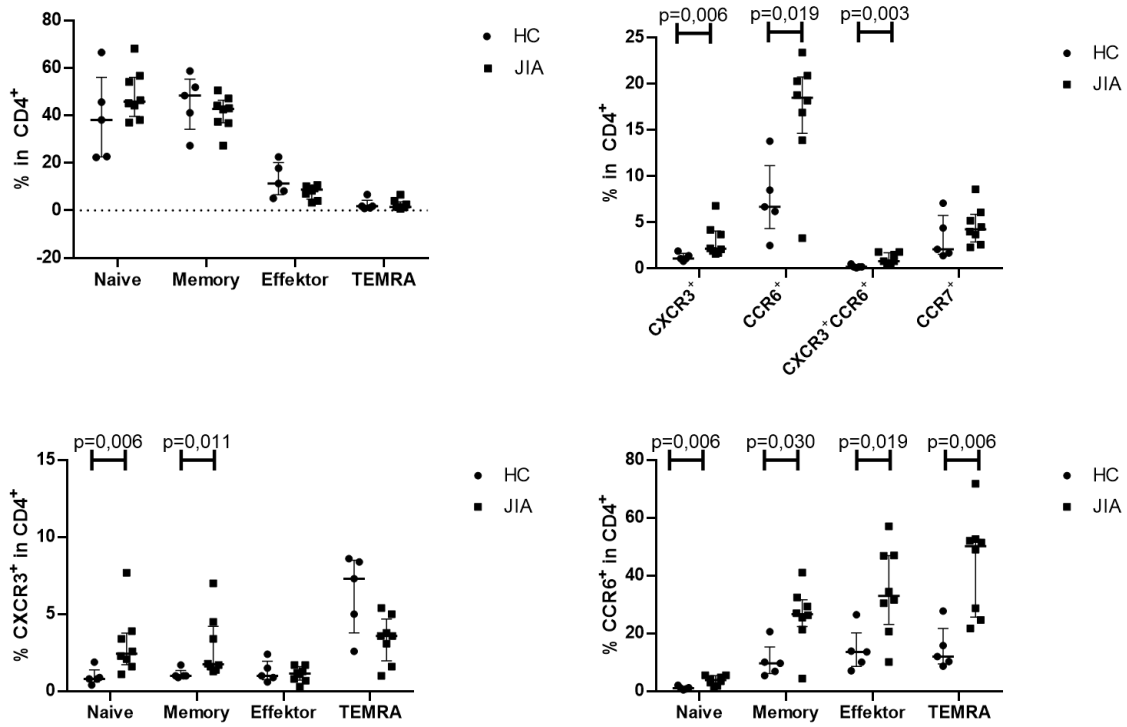
Prozentangaben der Anteile an den jeweiligen Subpopulationen  
 Nach dem Zombie-Gating (= Ausschluss der toten Zellen) wurden alle Gates in der lebendigen Lymphozytenpopulation (entspricht Nicht-Zombie) gesetzt.

#### 4.3.2.1 Reife- und Aktivitätsgrad der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen

CXCR3<sup>+</sup>- sowie CCR6<sup>+</sup>-Zellen waren anteilig an der CD4<sup>+</sup>-Population in der JIA-Kohorte im Vergleich zur Kontrollkohorte signifikant erhöht. Ebenso verhielt es sich mit den doppelpositiven CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen. Die CCR7<sup>+</sup>-Zellen waren bezogen auf die CD4<sup>+</sup>-Population in der Patientengruppe ebenfalls leicht erhöht, jedoch nicht signifikant. Bezüglich der einzelnen o.g. Reifegrade ließ sich kein Unterschied feststellen (vgl. Tabelle 27, Abbildung 15).

Der CXCR3<sup>+</sup>-Anteil in der CD4<sup>+</sup>-TEMRA-Zellpopulation der JIA-Gruppe war verglichen mit der Kontrollgruppe tendenziell erniedrigt, der in der CD4<sup>+</sup>-Naive- und CD4<sup>+</sup>-Memory-Zellpopulation hingegen signifikant erhöht. In der CD4<sup>+</sup>-Effektor-Population ließ sich kein signifikanter Unterschied bzgl. der CXCR3-Expression erkennen (vgl. Abbildung 15).

Die CCR6-Expression wiederum war in der JIA-Gruppe in sämtlichen o.g. CD4<sup>+</sup>-Subpopulationen signifikant erhöht (vgl. Abbildung 15).



**Abbildung 15: Vergleich des Reife- und Aktivitätsgrads der CD4<sup>+</sup>-Zellpopulationen zwischen Patienten- und Kontrollkohorte**

Darstellung in % mit Median und Interquartilrange. Oberhalb der eckigen Klammern sind die signifikanten P-Werte ( $p < 0,05$ ) abgebildet. HC = Healthy Control, JIA = juvenile idiopathische Arthritis

**Tabelle 27: Vergleich des Reife- und Aktivitätsgrads der CD4<sup>+</sup>-Zellen zwischen Patienten- und Kontrollkohorte**

		<b>HC</b>	<b>JIA</b>	<b>P-Wert</b>	<b>EAA</b>
<b>Probanden-Anzahl</b>		<b>5</b>	<b>8</b>		<b>2</b>
<b>Gate</b>	<b>Subpopulation</b>				
<b>CD4<sup>+</sup></b>	CXCR3 <sup>+</sup>	1,26 ± 0,42 (1,10; 0,8-1,9)	3,03 ± 1,80 (2,15; 1,6-6,8)	<b>0,006</b>	2,15 ± 0,35 (2,15; 1,9-2,4)
<b>CD4<sup>+</sup></b>	CCR6 <sup>+</sup>	7,54 ± 4,12 (6,70; 2,5-13,8)	16,96 ± 6,20 (18,50; 3,3-23,4)	<b>0,019</b>	5,25 ± 0,07 (5,25; 5,2-5,3)
<b>CD4<sup>+</sup></b>	CXCR3 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup>	0,24 ± 0,15 (0,20; 0,1-0,5)	1,06 ± 0,55 (0,80; 0,4-1,8)	<b>0,003</b>	0,55 ± 0,07 (0,55; 0,5-0,6)
<b>CD4<sup>+</sup></b>	CCR7 <sup>+</sup>	3,34 ± 2,41 (2,10; 1,4-7,1)	4,63 ± 2,04 (4,25; 2,3-8,6)	0,222	14,05 ± 5,16 (14,05; 10,4-17,7)
<b>CD4<sup>+</sup> Naive</b>		39,01 ± 18,32 (38,10; 22,4-66,5)	48,71 ± 10,40 (45,75; 37,0-68,1)	0,284	53,60 ± 5,94 (53,60; 49,4-57,8)
	CXCR3 <sup>+</sup>	0,96 ± 0,56 (0,80; 0,4-1,9)	3,09 ± 2,07 (2,45; 1,1-7,7)	<b>0,006</b>	1,85 ± 0,21 (1,85; 1,7-2,0)
	CCR6 <sup>+</sup>	1,14 ± 0,60 (1,10; 0,5-2,1)	3,78 ± 1,57 (3,90; 1,5-5,6)	<b>0,006</b>	2,70 ± 0,14 (2,70; 2,6-2,8)
<b>CD4<sup>+</sup> Memory</b>		45,48 ± 11,98 (48,40; 27,3-58,7)	41,09 ± 7,19 (42,75; 27,3-50,5)	0,354	36,25 ± 4,60 (36,25; 33,0-39,5)
	CXCR3 <sup>+</sup>	1,12 ± 0,33 (1,00; 0,9-1,7)	2,83 ± 2,03 (1,75; 1,3-7,0)	<b>0,011</b>	2,10 ± 0,28 (2,10; 1,9-2,3)
	CCR6 <sup>+</sup>	10,54 ± 5,95 (9,70; 5,4-20,6)	25,96 ± 10,49 (26,70; 4,4-41,1)	<b>0,030</b>	5,85 ± 1,06 (5,85; 5,1-6,6)
<b>CD4<sup>+</sup> Effektor</b>		13,00 ± 7,09 (11,40; 5,1-22,5)	7,75 ± 2,78 (8,75; 3,3-10,7)	0,222	7,00 ± 1,41 (7,00; 6,0-8,0)
	CXCR3 <sup>+</sup>	1,28 ± 0,70 (1,00; 0,6-2,4)	1,10 ± 0,49 (1,15; 0,3-1,7)	0,943	0,65 ± 0,07 (0,65; 0,6-0,7)
	CCR6 <sup>+</sup>	14,24 ± 7,40 (13,60; 7,1-26,5)	34,81 ± 15,24 (33,05; 10,2-57,1)	<b>0,019</b>	13,45 ± 7,99 (13,45; 7,8-19-1)
<b>CD4<sup>+</sup> TEMRA</b>		2,46 ± 2,40 (1,80; 0,9-6,7)	2,43 ± 1,97 (1,45; 0,7-6,6)	1,000	3,15 ± 0,07 (3,15; 3,1-3,2)
	CXCR3 <sup>+</sup>	6,38 ± 2,55 (7,30; 2,6-8,6)	3,39 ± 1,51 (3,60; 1,0-5,4)	0,065	3,00 ± 2,12 (3,00; 1,5-4,5)
	CCR6 <sup>+</sup>	14,92 ± 7,67 (12,00; 7,8-27,8)	44,05 ± 17,29 (50,25; 21,8-71,8)	<b>0,006</b>	27,90 ± 13,29 (27,90; 18,5-37,3)

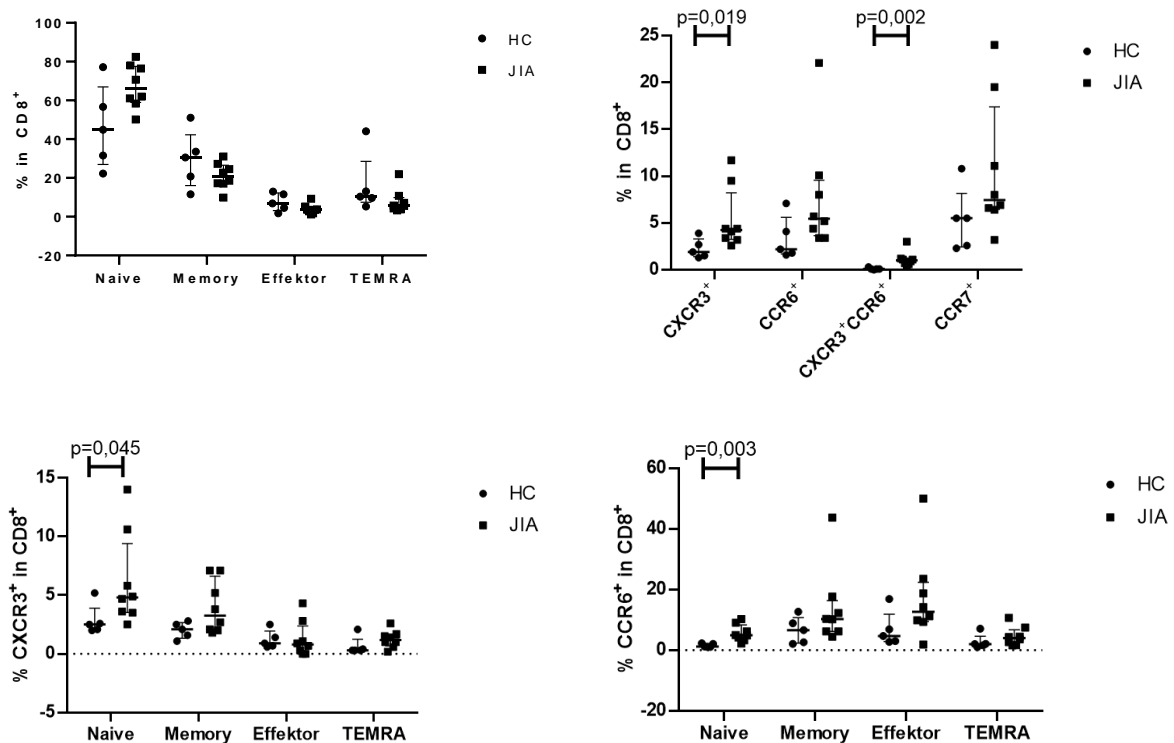
Werte in % anteilig an jeweiliger Lymphozytenpopulation. Angaben in Mittelwert ± Standardabweichung (Median; Minimum-Maximum)  
P-Wert-Angabe als Vergleich HC mit JIA (Mann-Whitney-U Test). Signifikanz: p<0,05 (fett)  
HC = Healthy Control, JIA = juvenile idiopathische Arthritis, EAA = Enthesitis-assoziierte Arthritis

Im deskriptiven Vergleich der JIA-Gruppe mit den separierten EAA-Patienten zeigte sich, dass die EAA-Patienten weniger CXCR3<sup>+</sup> und CCR6<sup>+</sup> Zellen in den

CD4-Lymphozytenpopulationen hatten, jedoch ein größerer Anteil CCR7<sup>+</sup>-Zellen vorlag (vgl. Tabelle 27).

#### 4.3.2.2 Reife- und Aktivitätsgrad der CD8<sup>+</sup>-Zellen

Es war ein signifikant erhöhter Anteil an CXCR3<sup>+</sup> und CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen in den CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten in der JIA-Gruppe feststellbar. CCR6<sup>+</sup> und CCR7<sup>+</sup>-Zellen waren hier ebenfalls tendenziell erhöht. Ferner ließ sich ein nicht-signifikant erhöhter Anteil an CD8<sup>+</sup> Naiven Zellen in der Patientengruppe messen. Die CXCR3 und CCR6-Expression war in dieser Subpopulation in JIA-Probanden signifikant erhöht (vgl. Tabelle 28, Abbildung 16).



**Abbildung 16: Vergleich des Reife- und Aktivitätsgrads der CD8<sup>+</sup>-Zellpopulationen zwischen Patienten- und Kontrollkohorte**

Darstellung in % mit Median und Interquartilrange. Oberhalb der eckigen Klammern sind die signifikanten P-Werte (p<0,05) abgebildet. HC = Healthy Control, JIA = juvenile idiopathische Arthritis.

**Tabelle 28: Vergleich des Reife- und Aktivitätsgrads der CD8<sup>+</sup>-Zellen zwischen Patienten- und Kontrollkohorte**

		<b>HC</b>	<b>JIA</b>	<b>P-Wert</b>	<b>EAA</b>
<b>Probanden-Anzahl</b>		<b>5</b>	<b>8</b>		<b>2</b>
<b>Gate</b>	<b>Subpopulation</b>				
<b>CD8<sup>+</sup></b>	CXCR3 <sup>+</sup>	2,26 ± 1,06 (1,90; 1,3-3,9)	5,41 ± 3,31 (4,25; 2,6-11,7)	<b>0,019</b>	2,75 ± 0,21 (2,75; 2,6-2,9)
<b>CD8<sup>+</sup></b>	CCR6 <sup>+</sup>	3,36 ± 2,31 (2,20; 1,6-7,1)	7,79 ± 6,23 (5,45; 3,4-22,1)	0,065	3,10 ± 0,71 (3,10; 2,6-3,6)
<b>CD8<sup>+</sup></b>	CXCR3 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup>	0,12 ± 0,11 (0,10; 0,0-0,3)	1,13 ± 0,81 (1,00; 0,4-3,0)	<b>0,002</b>	0,60 ± 0,14 (0,60; 0,5-0,7)
<b>CD8<sup>+</sup></b>	CCR7 <sup>+</sup>	5,34 ± 3,41 (5,50; 2,3-10,8)	10,71 ± 7,25 (7,45; 3,2-24,0)	0,065	24,65 ± 7,85 (24,65; 19,1-30,2)
<b>CD8<sup>+</sup> Naive</b>		46,50 ± 21,58 (44,80; 22,2-77,2)	67,36 ± 11,21 (66,30; 50,2-82,4)	0,065	62,95 ± 9,83 (62,95; 56,0-69,9)
	CXCR3 <sup>+</sup>	2,88 ± 1,32 (2,50; 2,0-5,2)	6,20 ± 4,00 (4,80; 2,5-14,0)	<b>0,045</b>	2,70 ± 0,42 (2,70; 2,4-3,0)
	CCR6 <sup>+</sup>	1,56 ± 0,59 (1,20; 1,1-2,3)	5,65 ± 2,79 (4,95; 2,2-10,3)	<b>0,003</b>	3,90 ± 1,27 (3,90; 3,0-4,8)
<b>CD8<sup>+</sup> Memory</b>		29,48 ± 14,88 (30,60; 11,5-51,1)	21,01 ± 6,69 (20,65; 9,9-31,0)	0,284	20,25 ± 2,05 (20,25; 18,8-21,7)
	CXCR3 <sup>+</sup>	2,02 ± 0,68 (2,10; 1,1-2,8)	3,98 ± 2,23 (3,25; 1,8-7,1)	0,127	4,80 ± 1,56 (4,80; 3,7-5,9)
	CCR6 <sup>+</sup>	6,58 ± 4,44 (6,60; 2,1-12,7)	13,91 ± 12,78 (10,30; 4,5-43,8)	0,284	2,45 ± 0,21 (2,45; 2,3-2,6)
<b>CD8<sup>+</sup> Effektor</b>		7,52 ± 4,66 (6,90; 1,8-12,9)	3,85 ± 2,54 (3,50; 1,1-9,3)	0,127	5,75 ± 0,92 (5,75; 5,1-6,4)
	CXCR3 <sup>+</sup>	1,22 ± 0,78 (0,90; 0,6-2,5)	1,26 ± 1,52 (0,80; 0,0-4,3)	0,724	2,35 ± 0,92 (2,35; 1,7-3,0)
	CCR6 <sup>+</sup>	6,86 ± 5,85 (4,70; 2,8-16,9)	17,38 ± 14,70 (12,70; 1,9-50,0)	0,127	2,55 ± 0,64 (2,55; 2,1-3,0)
<b>CD8<sup>+</sup> TEMRA</b>		16,50 ± 15,68 (10,40; 5,3-44,1)	7,79 ± 6,18 (5,60; 3,2-21,9)	0,171	11,05 ± 6,86 (11,05; 6,2-15,9)
	CXCR3 <sup>+</sup>	0,68 ± 0,79 (0,30; 0,3-2,1)	1,25 ± 0,74 (1,20; 0,2-2,6)	0,222	1,70 ± 1,41 (1,70; 0,7-2,7)
	CCR6 <sup>+</sup>	2,76 ± 2,46 (2,00; 1,0-7,1)	4,59 ± 3,11 (4,00; 1,6-10,7)	0,171	2,95 ± 1,63 (2,95; 1,8-4,1)

Werte in % anteilig an jeweiliger Lymphozytenpopulation. Angaben in Mittelwert ± Standardabweichung (Median; Minimum-Maximum)  
P-Wert-Angabe als Vergleich HC mit JIA (Mann-Whitney-U Testt). Signifikanz: p<0,05 (fett)  
HC = Healthy Control, JIA = juvenile idiopathische Arthritis, EAA = Enthesitis-assoziierte Arthritis

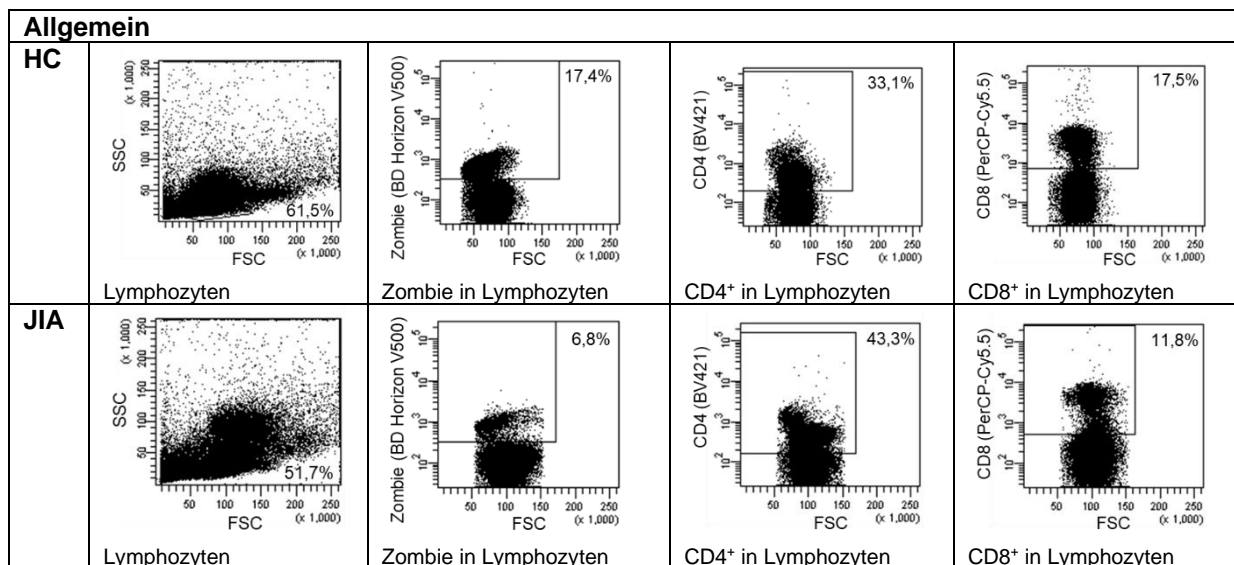
Im deskriptiven Vergleich der JIA- mit der EAA-Gruppe ließen sich wie bereits in der CD4<sup>+</sup>-Lymphozytenpopulation eine niedrigere CXCR3- und CCR6-Expression, jedoch ein erhöhter Anteil an CCR7<sup>+</sup>-Zellen in den CD8<sup>+</sup>-T-Zellen der EAA-Patienten feststellen (vgl. Tabelle 28).

### 4.3.3 Analyse der zytotoxischen Charakteristika im Lymphozytenpool

#### 4.3.3.1 Zytotoxische Charakteristika in stimulierten Zellen

Die im Panel zur Ermittlung der Zytotoxizität gefärbten Zellen wurden nach gleicher Prozedur wie die übrigen Zellen stimuliert und die zytotoxischen Eigenschaften (Perforin- und Granzymb-Produktion) analysiert und statistisch ausgewertet. In Tabelle 29 ist das Beispielgating je einer gesunden Kontrolle und eines JIA-Patienten abgebildet.

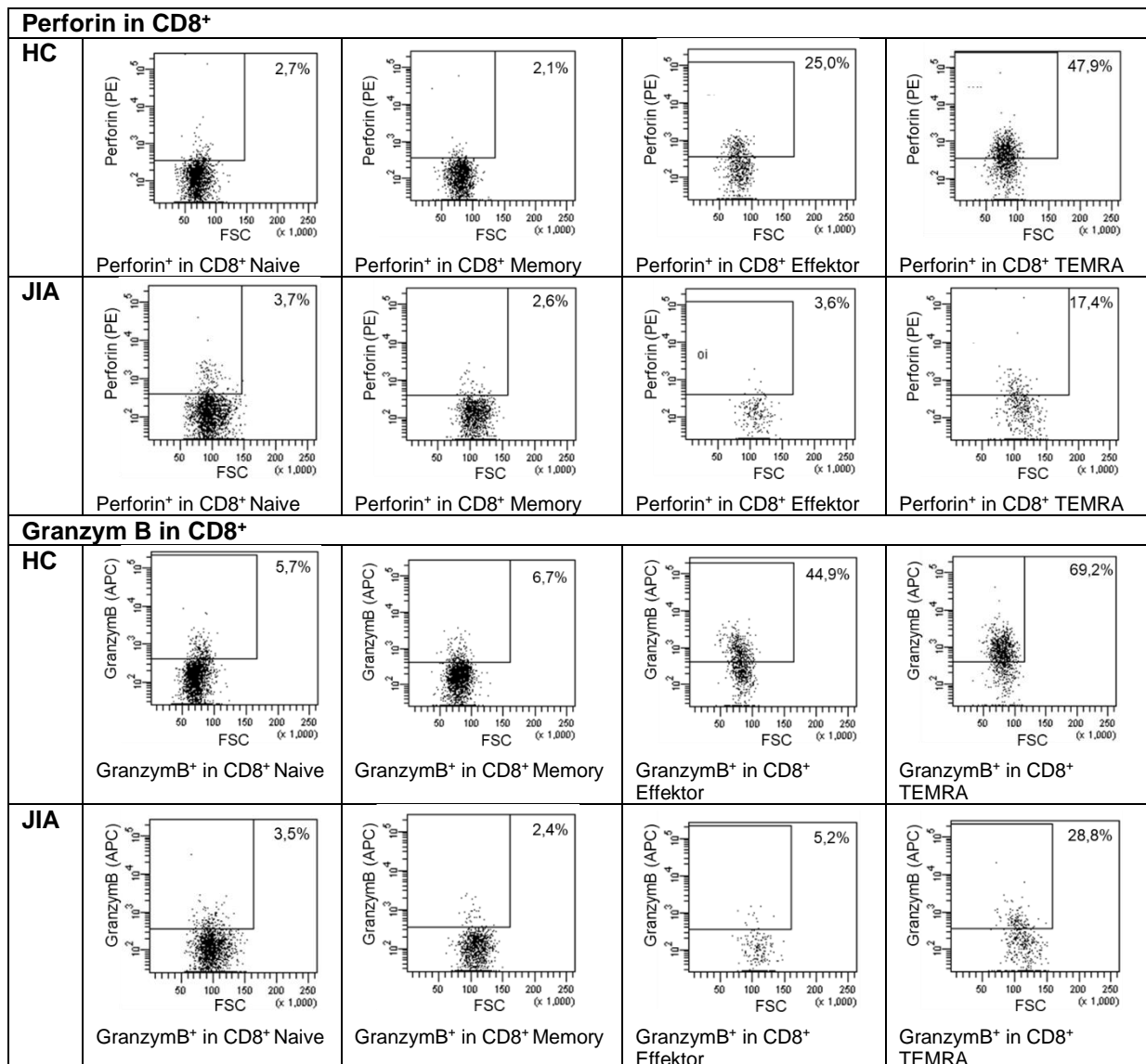
**Tabelle 29: PBMC-Charakterisierung des zytotoxischen Profils der Lymphozyten einer gesunden Kontrolle (HC) und eines Patienten (JIA) nach Stimulation**





<b>CD4<sup>+</sup>-Zellen</b>				
<b>HC</b>	<p>GranzymB (APC) Perforin (PE)</p> <p>Perforin und GranzymB in CD4<sup>+</sup></p>	<p>CCR7 (APC-Cy7) FSC (x 1,000)</p> <p>CCR7<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup></p>	<p>CD45RA (FITC) CD27 (PE-Cy7)</p> <p>Zellverunreinigungen</p>	<p>CD45RA (FITC) CD27 (PE-Cy7)</p> <p>a) TEMRA in CD4<sup>+</sup> b) Naive in CD4<sup>+</sup> c) Effektor in CD4<sup>+</sup> d) Memory in CD4<sup>+</sup></p>
<b>JIA</b>	<p>GranzymB (APC) Perforin (PE)</p> <p>Perforin und GranzymB in CD4<sup>+</sup></p>	<p>CCR7 (APC-Cy7) FSC (x 1,000)</p> <p>CCR7<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup></p>	<p>CD45RA (FITC) CD27 (PE-Cy7)</p> <p>Zellverunreinigungen</p>	<p>CD45RA (FITC) CD27 (PE-Cy7)</p> <p>a) TEMRA in CD4<sup>+</sup> b) Naive in CD4<sup>+</sup> c) Effektor in CD4<sup>+</sup> d) Memory in CD4<sup>+</sup></p>
<b>Perforin in CD4<sup>+</sup></b>				
<b>HC</b>	<p>Perforin (PE) FSC (x 1,000)</p> <p>Perforin<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> Naive</p>	<p>Perforin (PE) FSC (x 1,000)</p> <p>Perforin<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> Memory</p>	<p>Perforin (PE) FSC (x 1,000)</p> <p>Perforin<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> Effektor</p>	<p>Perforin (PE) FSC (x 1,000)</p> <p>Perforin<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> TEMRA</p>
<b>JIA</b>	<p>Perforin (PE) FSC (x 1,000)</p> <p>Perforin<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> Naive</p>	<p>Perforin (PE) FSC (x 1,000)</p> <p>Perforin<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> Memory</p>	<p>Perforin (PE) FSC (x 1,000)</p> <p>Perforin<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> Effektor</p>	<p>Perforin (PE) FSC (x 1,000)</p> <p>Perforin<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> TEMRA</p>

<b>Granzym B in CD4<sup>+</sup></b>				
<b>HC</b>	<p>GranzymB<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> Naive</p>	<p>GranzymB<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> Memory</p>	<p>GranzymB<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> Effektor</p>	<p>GranzymB<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> TEMRA</p>
<b>JIA</b>	<p>GranzymB<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> Naive</p>	<p>GranzymB<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> Memory</p>	<p>GranzymB<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> Effektor</p>	<p>GranzymB<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> TEMRA</p>
<b>CD8<sup>+</sup>-Zellen</b>				
<b>HC</b>	<p>Perforin und GranzymB in CD8<sup>+</sup></p>	<p>CCR7<sup>+</sup> in CD8<sup>+</sup></p>	<p>Zellverunreinigungen</p>	<p>a) TEMRA in CD8<sup>+</sup> b) Naive in CD8<sup>+</sup> c) Effektor in CD8<sup>+</sup> d) Memory in CD8<sup>+</sup></p>
<b>JIA</b>	<p>Perforin und GranzymB in CD8<sup>+</sup></p>	<p>CCR7<sup>+</sup> in CD8<sup>+</sup></p>	<p>Zellverunreinigungen</p>	<p>a) TEMRA in CD8<sup>+</sup> b) Naive in CD8<sup>+</sup> c) Effektor in CD8<sup>+</sup> d) Memory in CD8<sup>+</sup></p>



Prozentangaben der Anteile an den jeweiligen Subpopulationen  
 Nach dem Zombie-Gating (= Ausschluss der toten Zellen) wurden alle Gates in der lebendigen Lymphozytenpopulation (entspricht Nicht-Zombie) gesetzt.

In der Subpopulation der Naiven- und Memory-CD4<sup>+</sup>-Zellen fiel eine signifikant gesteigerte Perforinproduktion in der JIA-Gruppe verglichen mit den Kontrollen auf. In den Naiven-Zellen war außerdem der GranzymB<sup>+</sup>-Zellanteil signifikant erhöht. Der Anteil an Perforin<sup>+</sup>GranzymB<sup>+</sup>-Zellen an den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen war ebenfalls signifikant erhöht. Die Effektor- und TEMRA-CD4<sup>+</sup>-Zellen der JIA-Gruppe zeigten im Schnitt ein (nicht-signifikantes) geringeres zytotoxisches Profil.

Innerhalb der CD8<sup>+</sup>-Zellen zeigte sich im Vergleich der Patienten- mit der Kontrollgruppe lediglich bei der Perforinproduktion in den Memory-Zellen ein

signifikant gesteigertes Vorkommen in der JIA-Kohorte. Erwähnenswert sind weiterhin der (nicht-signifikant) erniedrigte Anteil an Perforin<sup>+</sup>GranzymB<sup>+</sup>-Zellen an den CD8<sup>+</sup>-Zellen in der Patientengruppe (vgl. Tabelle 30, Abbildung 17).

**Tabelle 30: Vergleich des zytotoxischen Profils von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen bei Kontroll- und Patientenkohorte**

		HC	JIA	P-Wert	EAA
<b>Probanden-Anzahl</b>		<b>5</b>	<b>8</b>		<b>2</b>
<b>Gate</b>	<b>Sub-population</b>				
<b>CD4<sup>+</sup> Naive</b>	Perforin <sup>+</sup>	0,86 ± 0,31 (0,70; 0,6-1,2)	2,75 ± 1,99 (2,20; 0,2-6,6)	<b>0,030</b>	1,80 ± 0,71 (1,80; 1,3-2,3)
	GranzymB <sup>+</sup>	0,40 ± 0,20 (0,30; 0,2-0,7)	1,79 ± 0,98 (1,60; 0,3-3,6)	0,011	1,50 ± 0,42 (1,50; 1,2-1,8)
<b>CD4<sup>+</sup> Memory</b>	Perforin <sup>+</sup>	0,70 ± 0,27 (0,70; 0,3-1,0)	2,38 ± 1,71 (1,70; 0,2-5,0)	<b>0,030</b>	1,85 ± 0,92 (1,85; 1,2-1,5)
	GranzymB <sup>+</sup>	0,64 ± 0,29 (0,70; 0,3-1,0)	0,76 ± 0,42 (0,65; 0,4-1,5)	0,724	0,95 ± 0,49 (0,95; 0,6-1,3)
<b>CD4<sup>+</sup> Effektor</b>	Perforin <sup>+</sup>	1,00 ± 0,33 (1,00; 0,7-1,5)	0,91 ± 0,66 (0,85; 0,1-2,1)	0,622	1,30 ± 0,71 (1,30; 0,8-1,8)
	GranzymB <sup>+</sup>	3,56 ± 5,10 (1,00; 0,8-12,6)	2,06 ± 1,42 (1,85; 0,6-5,0)	0,833	4,25 ± 0,92 (4,25; 3,6-4,9)
<b>CD4<sup>+</sup> TEMRA</b>	Perforin <sup>+</sup>	13,20 ± 4,94 (11,00; 7,9-18,9)	10,04 ± 2,76 (9,40; 7,7-16,3)	0,171	13,20 ± 5,37 (13,20; 9,4-17,0)
	GranzymB <sup>+</sup>	20,14 ± 7,41 (20,40; 11,7-27,7)	16,88 ± 11,55 (12,90; 7,8-43,2)	0,284	26,55 ± 8,98 (26,5; 20,2-32,9)
<b>CD4<sup>+</sup></b>	Perforin <sup>+</sup> GranzymB <sup>+</sup>	0,30 ± 0,28 (0,20; 0,1-0,8)	0,69 ± 0,36 (0,60; 0,2-1,4)	0,065	0,55 ± 0,07 (0,55; 0,5-0,6)
<b>CD8<sup>+</sup> Naive</b>	Perforin <sup>+</sup>	2,60 ± 1,07 (2,20; 1,8-4,4)	3,68 ± 2,38 (2,95; 0,6-7,5)	0,284	1,80 ± 0,85 (1,80; 1,2-2,4)
	GranzymB <sup>+</sup>	7,16 ± 5,22 (5,70; 1,3-13,2)	5,21 ± 4,24 (3,60; 1,3-13,5)	0,524	4,55 ± 0,64 (4,55; 4,1-5,0)
<b>CD8<sup>+</sup> Memory</b>	Perforin <sup>+</sup>	1,70 ± 0,61 (1,70; 0,8-2,4)	3,31 ± 1,75 (2,60; 1,8-6,7)	<b>0,030</b>	2,35 ± 0,35 (2,35; 2,1-2,6)
	GranzymB <sup>+</sup>	7,18 ± 4,27 (6,70; 1,1-11,6)	7,92 ± 5,31 (7,30; 1,9-15,4)	1,000	9,00 ± 3,25 (9,00; 6,7-11,3)
<b>CD8<sup>+</sup> Effektor</b>	Perforin <sup>+</sup>	11,70 ± 8,71 (8,10; 2,6-25,0)	12,69 ± 9,55 (12,05; 1,5-28,6)	1,000	15,85 ± 7,00 (15,85; 10,9-20,8)
	GranzymB <sup>+</sup>	33,92 ± 17,55 (36,40; 6,2-51,9)	29,15 ± 21,11 (26,10; 5,2-55,5)	0,833	53,50 ± 1,98 (53,50; 52,1-54,9)
<b>CD8<sup>+</sup> TEMRA</b>	Perforin <sup>+</sup>	23,62 ± 15,33 (21,90; 10,3-47,9)	25,31 ± 5,54 (26,60; 17,40-32,4)	0,435	24,50 ± 1,13 (24,50; 23,7-25,3)
	GranzymB <sup>+</sup>	56,26 ± 22,99 (69,20; 23,0-77,3)	48,16 ± 19,09 (52,45; 17,6-70,7)	0,435	61,35 ± 11,81 (61,35; 53,0-69,7)

		HC	JIA	P-Wert	EAA
<b>Probanden-Anzahl</b>		5	8		2
<b>Gate</b>	<b>Sub-population</b>				
<b>CD8<sup>+</sup></b>	Perforin <sup>+</sup> GranzymB <sup>+</sup>	4,92 ± 3,52 (4,40; 0,8-10,1)	3,04 ± 1,52 (2,55; 1,6-6,2)	0,284	4,05 ± 1,77 (4,05; 2,8-5,3)

Werte in % anteilig an jeweiliger Lymphozytenpopulation. Angaben in Mittelwert ± Standardabweichung (Median; Minimum-Maximum)

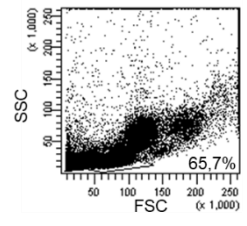
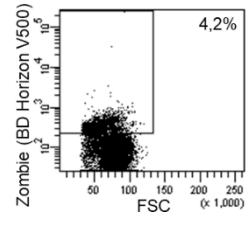
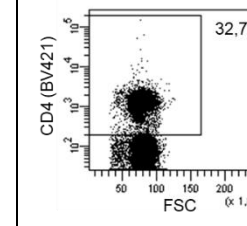
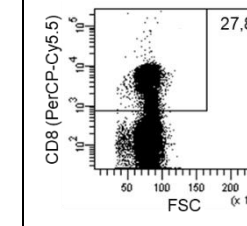
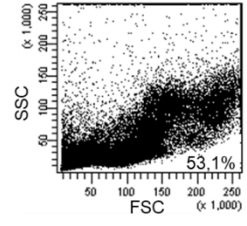
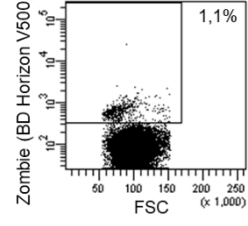
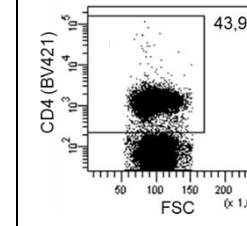
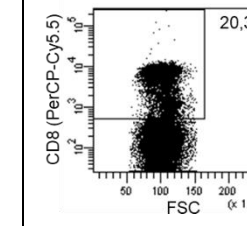
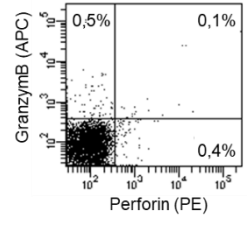
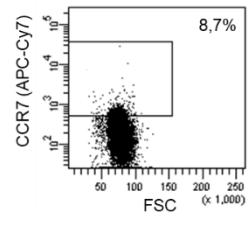
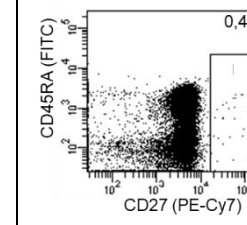
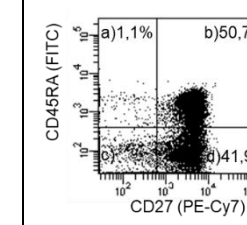
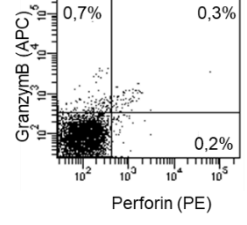
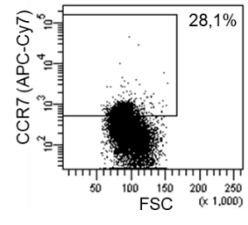
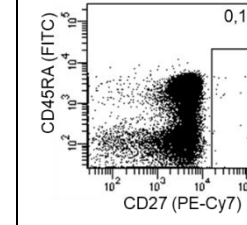
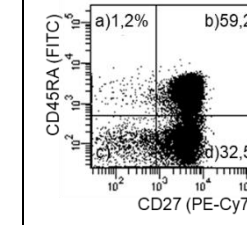
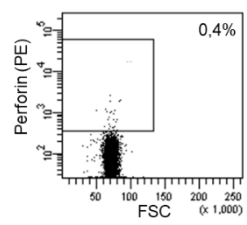
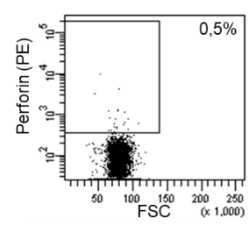
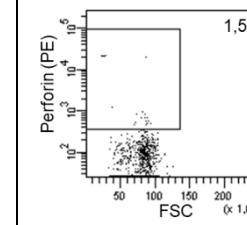
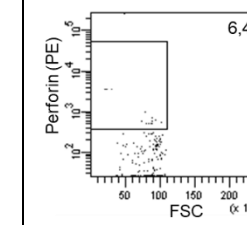
P-Wert-Angabe als Vergleich HC mit JIA (Mann-Whitney-U Test). Signifikanz: p<0,05 (fett)  
 HC = Healthy Control, JIA = juvenile idiopathische Arthritis, EAA = Enthesitis-assoziierte Arthritis

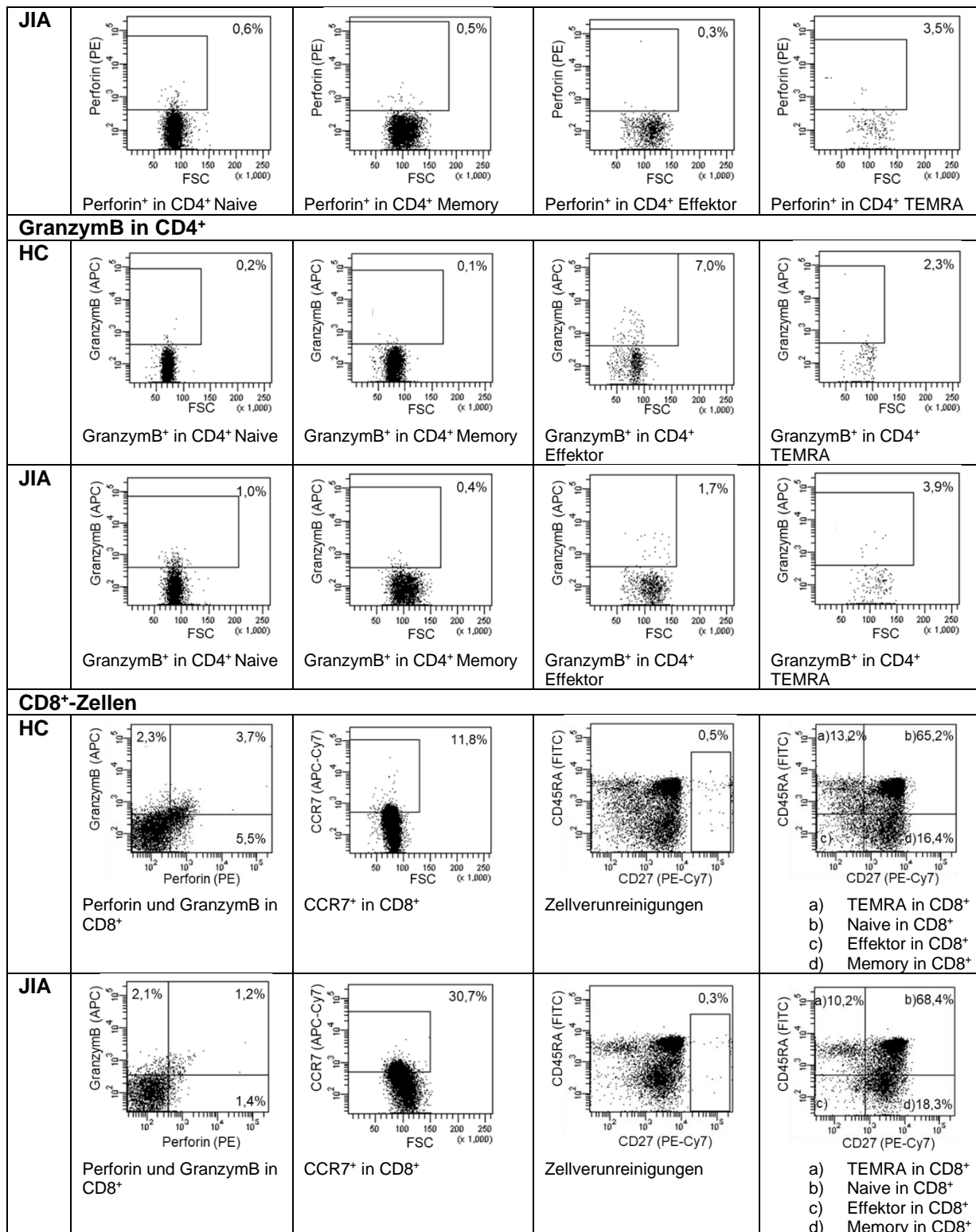
Im deskriptiven Vergleich der JIA-Gruppe mit den EAA-Patienten zeigte sich eine im Schnitt gesteigerte zytotoxische Zytokinproduktion der Effektor- und TEMRA-Zellen in den EAA-Proben (vgl. Tabelle 30).

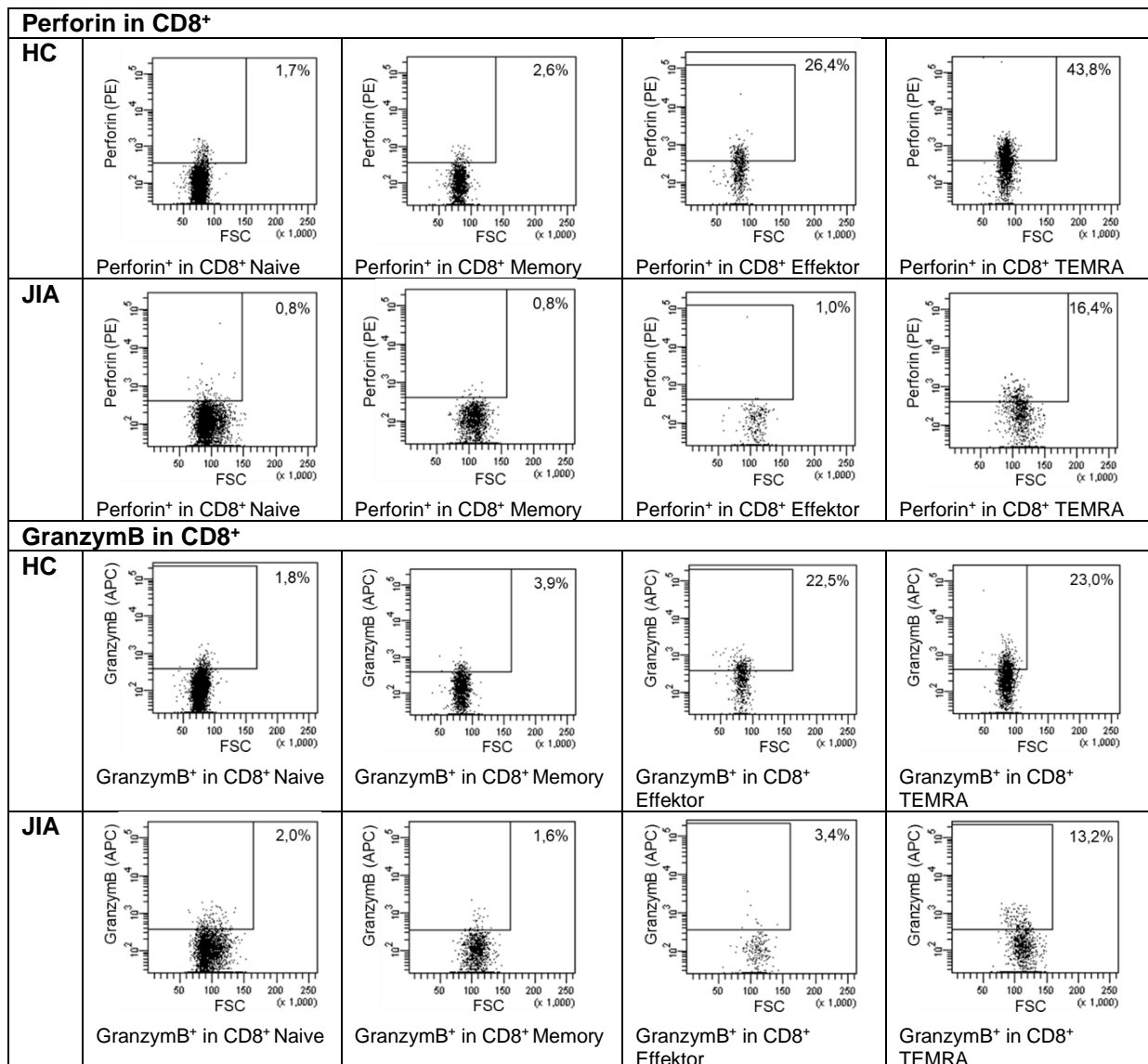
#### 4.3.3.2 *Zytotoxische Charakteristika in unstimulierten Zellen*

Um einen Einfluss der unspezifischen Zellstimulation mit PMA und Ionomycin auf die definierte Zytotoxizität der Lymphozyten zu untersuchen, wurden Unterschiede in der Zytokinexpression zwischen stimuliertem Ansatz und unstimuliertem Ansatz verglichen. In Tabelle 31 ist das Beispielgating je einer gesunden Kontrolle und eines JIA-Patienten abgebildet.

**Tabelle 31: PBMC-Charakterisierung der Zytotoxizität der Lymphozyten einer gesunden Kontrolle (HC) und eines Patienten (JIA) ohne Stimulation**

<b>Allgemein</b>				
<b>HC</b>	 Lymphozyten	 Zombie in Lymphozyten	 CD4 <sup>+</sup> in Lymphozyten	 CD8 <sup>+</sup> in Lymphozyten
<b>JIA</b>	 Lymphozyten	 Zombie in Lymphozyten	 CD4 <sup>+</sup> in Lymphozyten	 CD8 <sup>+</sup> in Lymphozyten
<b>CD4<sup>+</sup>-Zellen</b>				
<b>HC</b>	 Perforin und GranzymB in CD4 <sup>+</sup>	 CCR7 <sup>+</sup> in CD4 <sup>+</sup>	 Zellverunreinigungen	 a) TEMRA in CD4 <sup>+</sup> b) Naive in CD4 <sup>+</sup> c) Effektor in CD4 <sup>+</sup> d) Memory in CD4 <sup>+</sup>
<b>JIA</b>	 Perforin und GranzymB in CD4 <sup>+</sup>	 CCR7 <sup>+</sup> in CD4 <sup>+</sup>	 Zellverunreinigungen	 a) TEMRA in CD4 <sup>+</sup> b) Naive in CD4 <sup>+</sup> c) Effektor in CD4 <sup>+</sup> d) Memory in CD4 <sup>+</sup>
<b>Perforin in CD4<sup>+</sup></b>				
<b>HC</b>	 Perforin <sup>+</sup> in CD4 <sup>+</sup> Naive	 Perforin <sup>+</sup> in CD4 <sup>+</sup> Memory	 Perforin <sup>+</sup> in CD4 <sup>+</sup> Effektor	 Perforin <sup>+</sup> in CD4 <sup>+</sup> TEMRA





Prozentangaben der Anteile an den jeweiligen Subpopulationen  
 Nach dem Zombie-Gating (= Ausschluss der toten Zellen) wurden alle Gates in der lebendigen Lymphozytenpopulation (entspricht Nicht-Zombie) gesetzt.

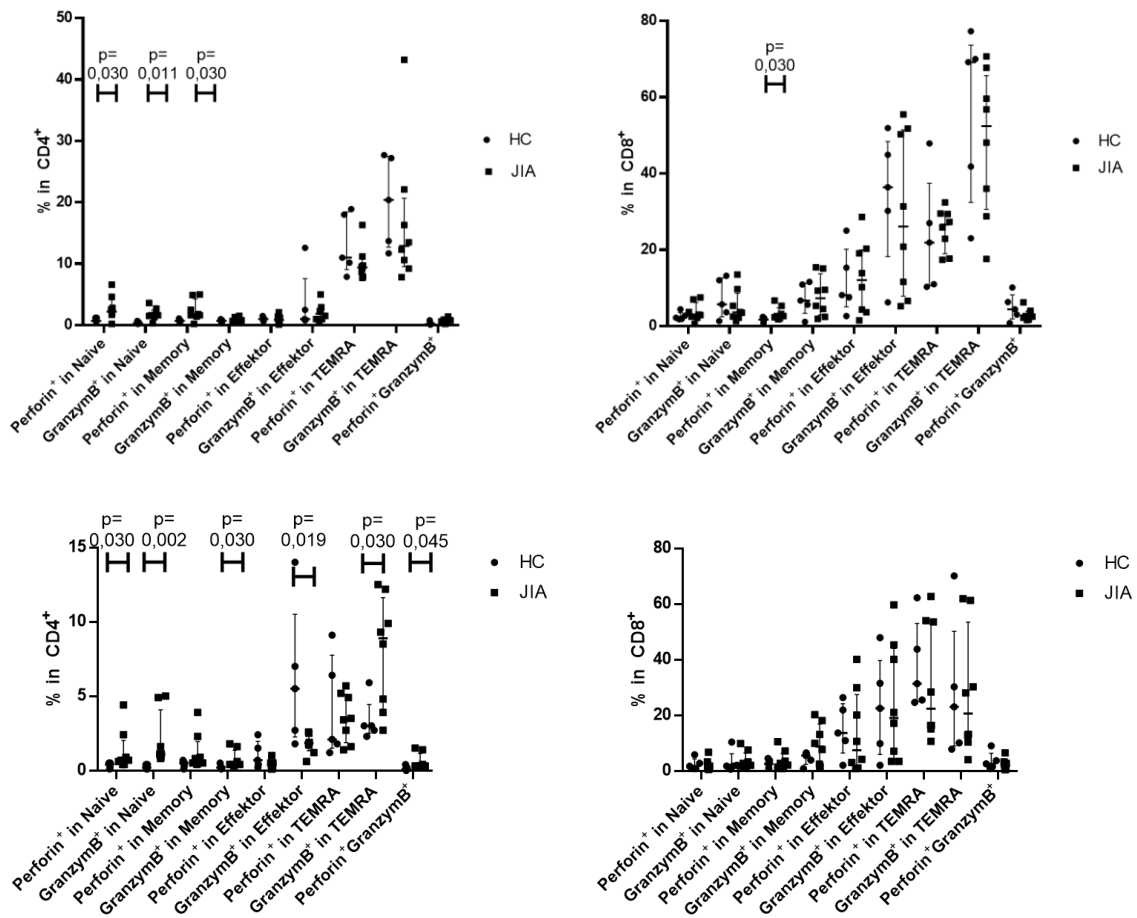
Die Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen zeigten sich zum Großteil analog zur stimulierten Färbung. Es fanden sich ebenfalls eine signifikant gesteigerte Zytokinproduktion in den CD4<sup>+</sup>-Naiven-Zellen der Patienten. In den CD4<sup>+</sup>-Memory-Zellen wurde hier statt der signifikant erhöhten Perforin-Produktion (die sich nur noch als Tendenz erkennen ließ) nun eine signifikant gesteigerte GranzymbB-Produktion in der JIA-Gruppe gemessen (p=0,030).

Die vermehrte GranzymbB-Produktion in den CD4<sup>+</sup>-Effektor-Zellen der Kontrollgruppe ist im unstimulierten Ansatz als signifikant zu verzeichnen (p = 0,019).



Auffällig war ferner eine signifikante Steigerung der GranzymB-Produktion innerhalb der CD4<sup>+</sup>-TEMRA-Zellen in der Patientenkohorte (p = 0,030) im unstimulierten Ansatz. Die Perforinproduktion der CD4<sup>+</sup>-TEMRA-Zellen zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen.

Innerhalb der CD8<sup>+</sup>-Zellpopulation zeigten sich in dem unstimulierten Ansatz keinerlei signifikante Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollgruppe (vgl. Abbildung 17).



**Abbildung 17: Prozentualer Anteil der zytotoxischen Zytokine in CD4<sup>+</sup>-Zellen (linke Seite) und CD8<sup>+</sup>-Zellen (rechte Seite) im Vergleich zwischen Stimulation mit PMA und Ionomycin (oben) und ohne Stimulation (unten)**

Darstellung in % mit Median und Interquartilrange. Oberhalb der eckigen Klammern sind die signifikanten P-Werte (p<0,05) abgebildet. HC = Healthy Control, JIA = juvenile idiopathische Arthritis

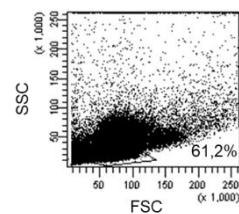
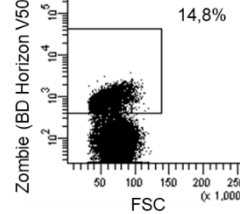
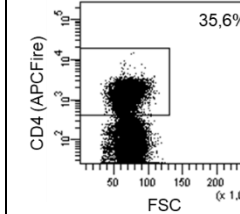
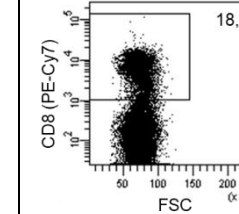
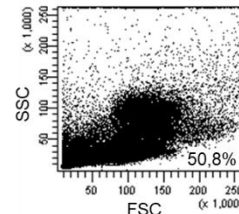
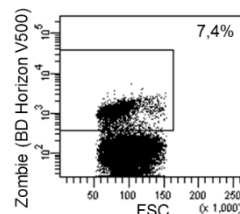
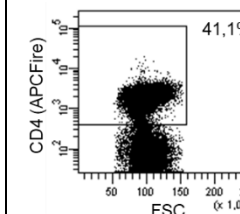
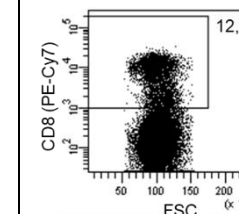
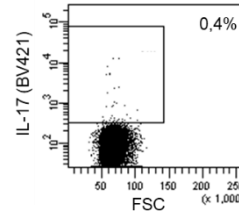
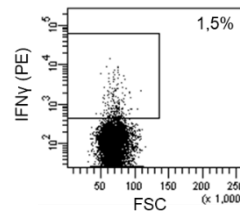
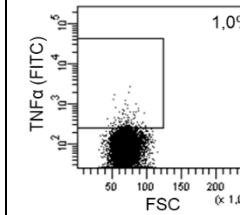
Beim deskriptiven Vergleich der beiden Patientenuntergruppen spiegelten sich im unstimulierten Ansatz ähnliche Verhältnisse wie im stimulierten Ansatz wider.

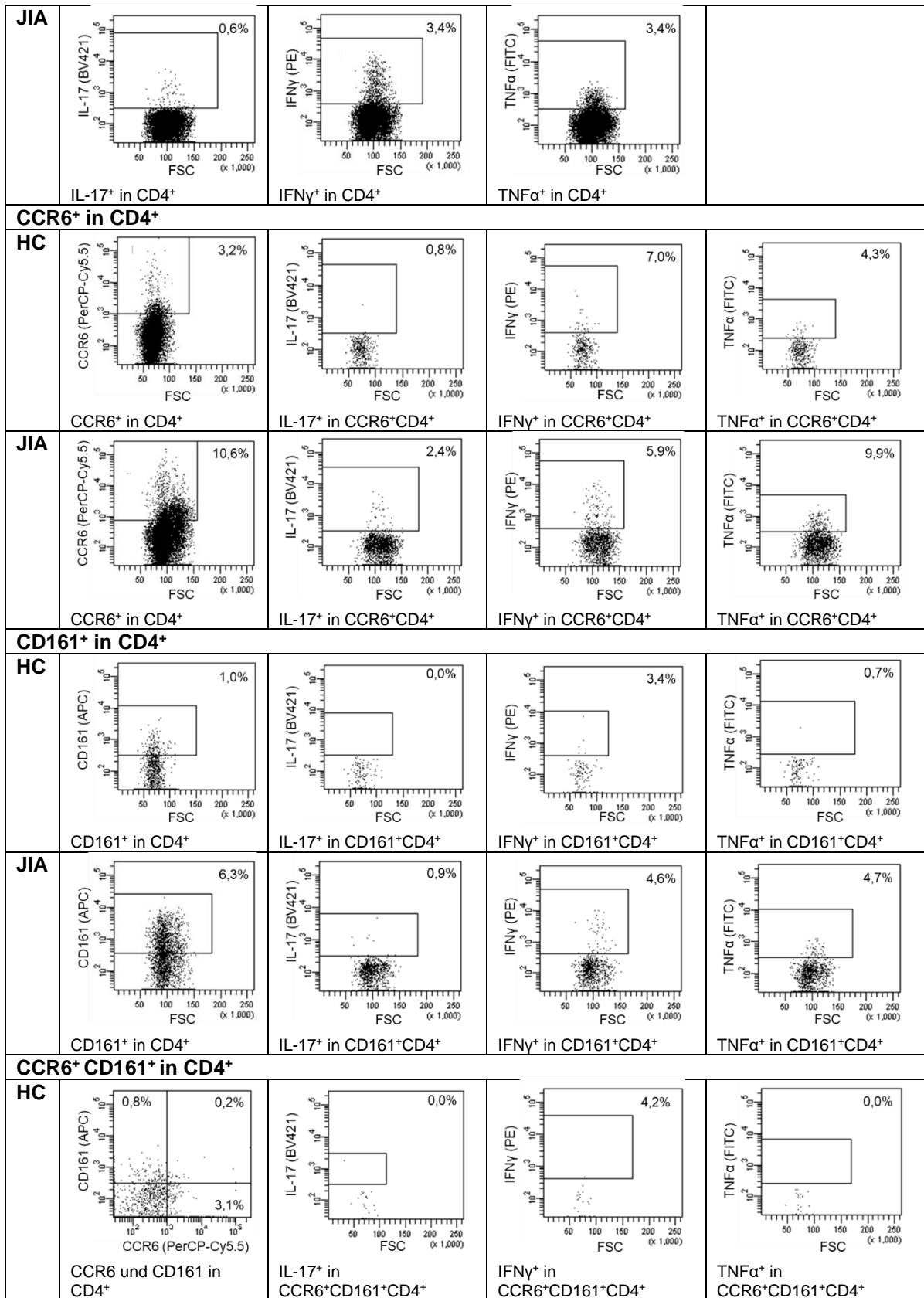
Auch hier war die Zytokinproduktion in den Effektor und TEMRA-CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen in der EAA-Gruppe durchschnittlich erhöht.

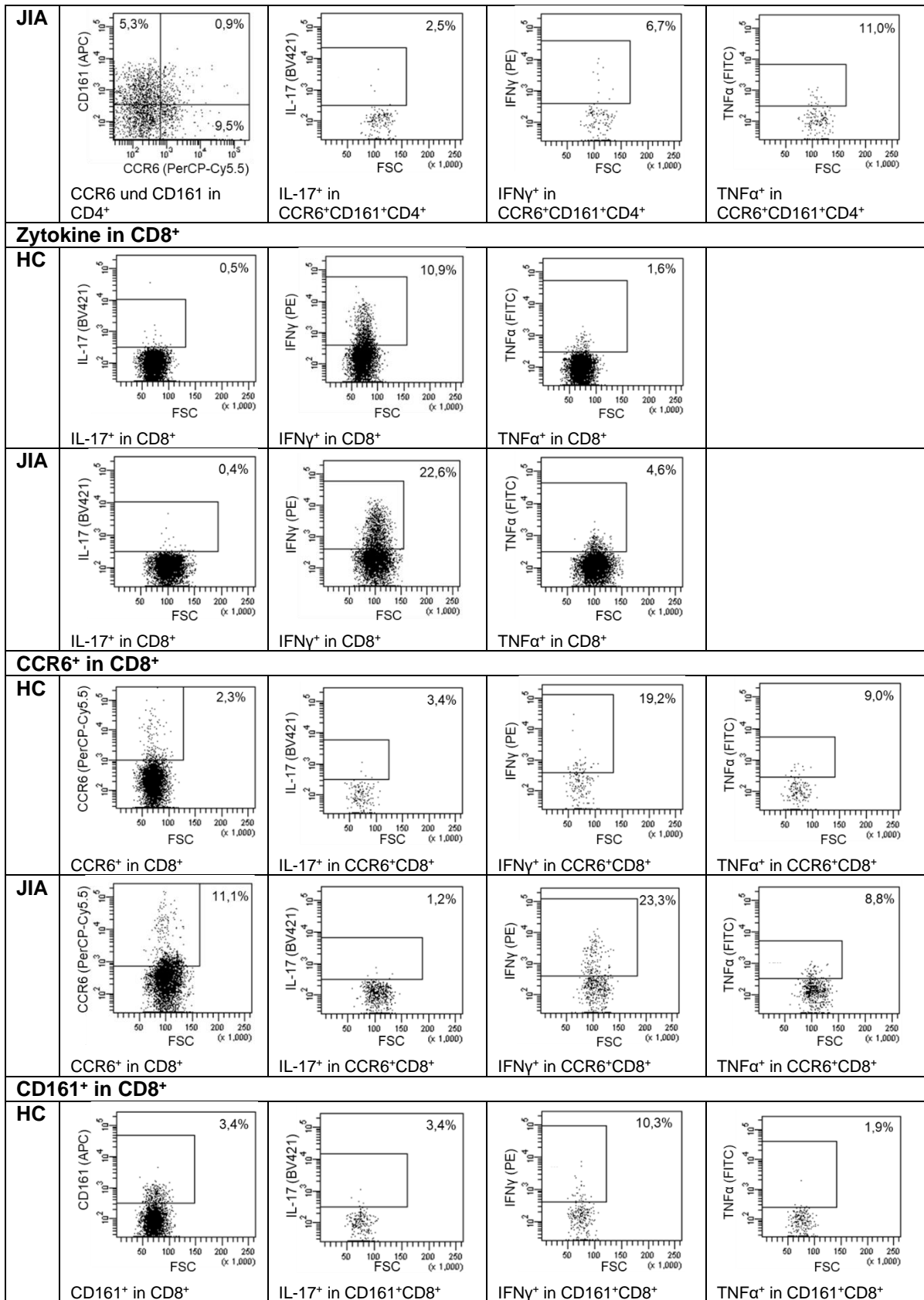
#### 4.3.4 Analyse der Th1-Zell- und Th17-Zell-Verteilung im Lymphozytenpool

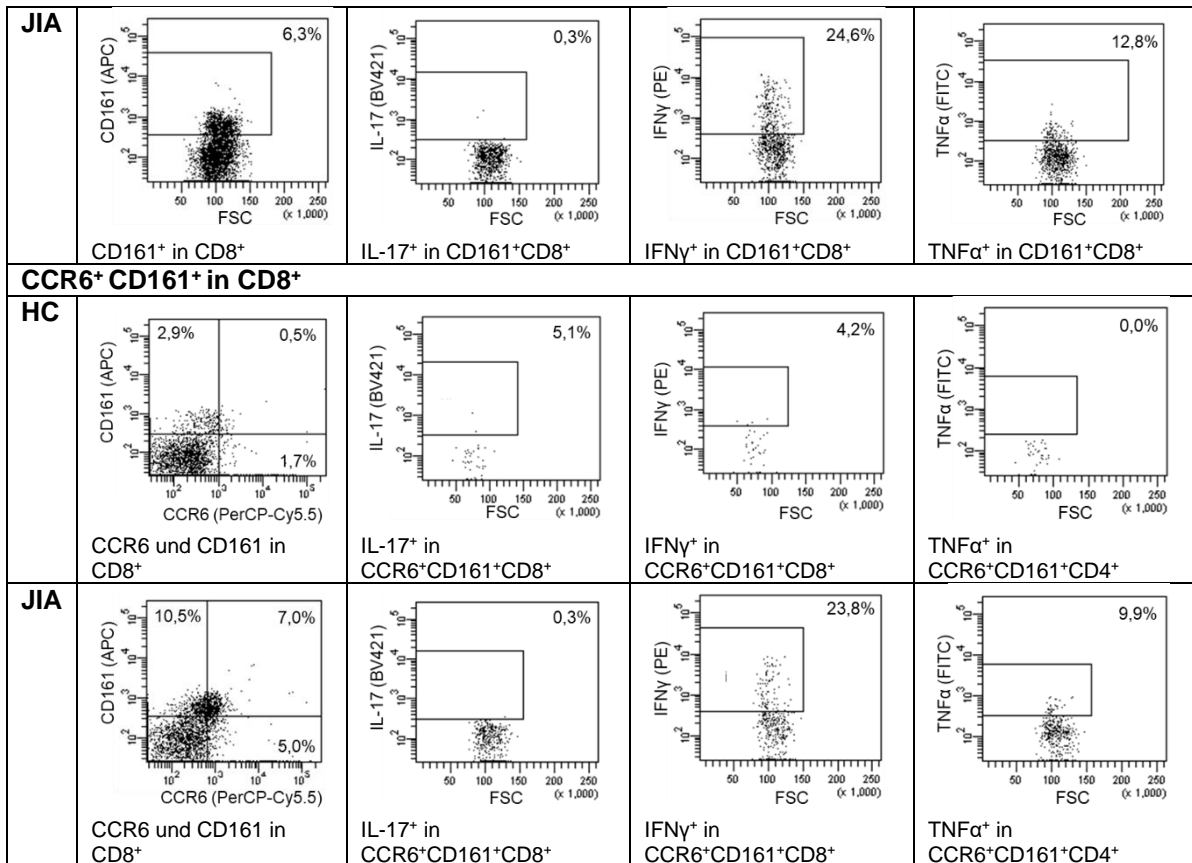
Die in der PBMC-Charakterisierung durchgeführte Bestimmung und Charakterisierung der Th1- und Th17-Zellen wird im Folgenden anhand der deskriptiven Statistik und Signifikanzprüfung auf Unterschiede zwischen den Probandenpopulationen beschrieben. Zunächst wird in Tabelle 32 das Beispielgating je einer gesunden Kontrolle und eines JIA-Patienten gezeigt.

**Tabelle 32: PBMC-Charakterisierung der Th1-Zell- und Th17-Zell-Verteilung einer gesunden Kontrolle (HC) und eines Patienten (JIA)**

Allgemein				
<b>HC</b>	 <p>Lymphozyten</p>	 <p>Zombie in Lymphozyten</p>	 <p>CD4<sup>+</sup> in Lymphozyten</p>	 <p>CD8<sup>+</sup> in Lymphozyten</p>
<b>JIA</b>	 <p>Lymphozyten</p>	 <p>Zombie in Lymphozyten</p>	 <p>CD4<sup>+</sup> in Lymphozyten</p>	 <p>CD8<sup>+</sup> in Lymphozyten</p>
Zytokine in CD4 <sup>+</sup>				
<b>HC</b>	 <p>IL-17<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup></p>	 <p>IFNγ<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup></p>	 <p>TNFα<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup></p>	







Prozentangaben der Anteile an den jeweiligen Subpopulationen

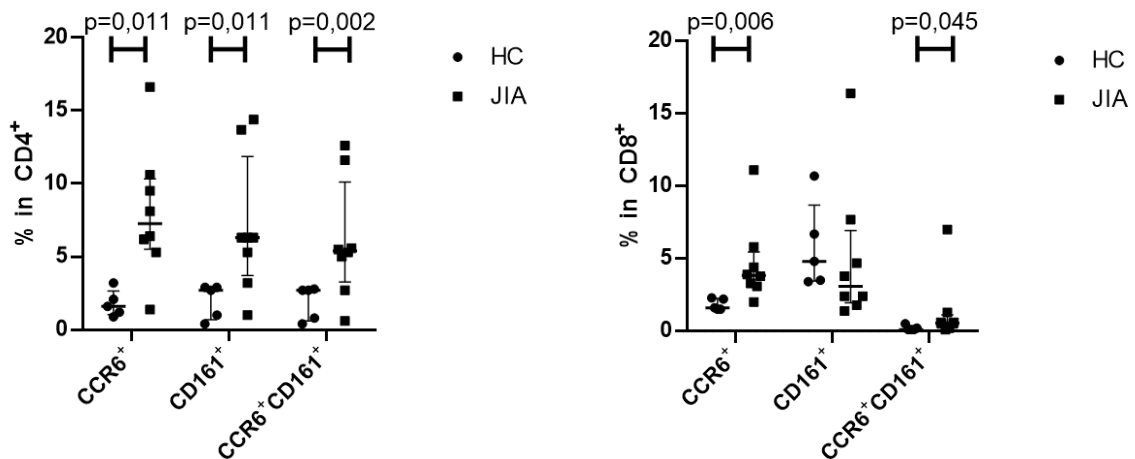
Nach dem Zombie-Gating (= Ausschluss der toten Zellen) wurden alle Gates in der lebendigen Lymphozytenpopulation (entspricht Nicht-Zombie) gesetzt.

#### 4.3.4.1 Zytokinproduktion in der CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation sowie CCR6<sup>+</sup> und CD161<sup>+</sup>-Zellen und deren Zytokinproduktion in der CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation

Hinsichtlich der Zytokinproduktion innerhalb der CD4<sup>+</sup>-Zellen ergab sich kein signifikanter Unterschied bezüglich IFNγ und TNFα, jedoch eine signifikant erhöhte IL-17-Produktion in der JIA-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe.

Es zeigte sich ein signifikant erhöhter Anteil an CCR6<sup>+</sup>-, CD161<sup>+</sup>- und CCR6<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>-Zellen in der CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation in der JIA-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe (vgl. Abbildung 18). Ebenfalls war eine nicht-signifikante Steigerung der IL-17-Produktion in diesen Subpopulationen in der Patientengruppe zu verzeichnen. IFNγ war in den CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen signifikant erniedrigt (vgl. Tabelle 33).

Im Vergleich der JIA-Gruppe mit den beiden EAA-Patienten zeigte sich in den CD4<sup>+</sup>-Zellen sowie den o.g. Subgruppen eine deutlich gesteigerte IL-17-Produktion in den EAA-Probanden. Gleichzeitig zeigte sich hier ein geringerer Anteil an CCR6<sup>+</sup>, CD161<sup>+</sup> und CCR6<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>-Zellen in der CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation (vgl. Tabelle 33).



**Abbildung 18: Th1/Th17-Charakteristika in den CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellpopulationen**

Darstellung in % mit Median und Interquartilrange. Oberhalb der eckigen Klammern sind die signifikanten P-Werte ( $p < 0,05$ ) abgebildet. HC = Healthy Control, JIA = juvenile idiopathische Arthritis

**Tabelle 33: Vergleich der Th1/Th17-Charakteristika in der CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation bei Patienten und Kontrollen**

		HC	JIA	P-Wert	EAA
<b>Probanden-Anzahl</b>		5	8		2
<b>Gate</b>	<b>Sub-population</b>				
<b>CD4<sup>+</sup></b>	<b>IL-17<sup>+</sup></b>	0,24 ± 0,09 (0,30; 0,1-0,3)	1,10 ± 0,79 (0,80; 0,5-2,9)	<b>0,002</b>	1,45 ± 0,21 (1,45; 1,3-1,6)
	<b>IFN<math>\gamma</math><sup>+</sup></b>	3,32 ± 2,71 (1,90; 1,3-7,7)	3,21 ± 1,06 (3,40; 1,8-5,1)	0,622	2,45 ± 0,78 (2,45; 1,9-3,0)
	<b>TNF<math>\alpha</math><sup>+</sup></b>	1,44 ± 0,75 (1,00; 0,8-2,4)	3,00 ± 1,96 (2,60; 0,7-6,2)	0,222	3,25 ± 1,77 (3,25; 2,0-4,5)
<b>CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></b>		1,80 ± 0,90 (1,60; 0,9-3,2)	8,01 ± 4,347 (7,25; 1,4-16,6)	<b>0,011</b>	3,70 ± 1,13 (3,70; 2,9-4,5)
	<b>IL-17<sup>+</sup></b>	2,42 ± 1,88 (3,40; 0,0-4,1)	3,65 ± 1,23 (3,75; 1,9-5,6)	0,284	8,50 ± 0,50 (8,50; 7,7-8,4)
	<b>IFN<math>\gamma</math><sup>+</sup></b>	10,64 ± 2,76 (11,90; 7,0-13,8)	6,88 ± 3,19 (6,15; 3,4-13,2)	<b>0,045</b>	7,50 ± 0,00 (7,50; 7,5-7,5)

	<b>TNF<math>\alpha</math><sup>+</sup></b>	8,02 $\pm$ 2,66 (8,80; 4,3-10,6)	7,99 $\pm$ 4,28 (7,25; 2,9-14,8)	0,833	9,20 $\pm$ 0,57 (9,20; 8,5-9,6)
<b>CD161<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></b>		1,98 $\pm$ 1,19 (2,70; 0,4-2,9)	7,06 $\pm$ 4,70 (6,30; 1,0-14,4)	<b>0,011</b>	4,95 $\pm$ 1,49 (4,95; 3,9-6,0)
	<b>IL-17<sup>+</sup></b>	1,80 $\pm$ 3,04 (0,70; 0,0-7,2)	2,05 $\pm$ 1,16 (1,85; 0,5-3,8)	0,171	2,10 $\pm$ 0,71 (2,10; 1,6-2,6)
	<b>IFN<math>\gamma</math><sup>+</sup></b>	6,98 $\pm$ 5,63 (5,40; 2,4-16,5)	5,14 $\pm$ 2,05 (5,25; 2,6-7,9)	0,943	3,40 $\pm$ 1,84 (3,40; 2,1-4,7)
	<b>TNF<math>\alpha</math><sup>+</sup></b>	2,52 $\pm$ 1,75 (2,70; 0,7-4,6)	4,16 $\pm$ 2,41 (3,65; 1,2-7,9)	0,222	4,35 $\pm$ 3,46 (4,35; 1,9-6,8)
<b>CCR6<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></b>		0,08 $\pm$ 0,08 (0,10; 0,0-0,2)	0,85 $\pm$ 0,60 (0,70; 0,2-1,8)	<b>0,002</b>	0,30 $\pm$ 0,00 (0,30; 0,3-0,3)
	<b>IL-17<sup>+</sup></b>	2,86 $\pm$ 6,40 (0,00; 0,0-14,3)	4,78 $\pm$ 2,43 (5,10; 1,8-7,8)	0,093	8,95 $\pm$ 8,13 (8,95; 3,2-14,7)
	<b>IFN<math>\gamma</math><sup>+</sup></b>	9,22 $\pm$ 6,68 (13,30; 0,0-14,3)	8,01 $\pm$ 3,45 (8,25; 3,0-12,5)	0,435	6,45 $\pm$ 9,12 (6,45; 0,0-12,9)
	<b>TNF<math>\alpha</math><sup>+</sup></b>	8,38 $\pm$ 12,69 (0,00; 0,0-28,6)	7,16 $\pm$ 4,74 (7,90; 0,0-12,9)	0,724	9,40 $\pm$ 4,95 (9,40; 5,9-12,9)

Werte in % anteilig an jeweiliger Lymphozytenpopulation. Angaben in Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (Median; Minimum-Maximum)  
P-Wert-Angabe als Vergleich HC mit JIA (Mann-Whitney-U Test). Signifikanz: p<0,05 (fett)  
HC = Healthy Control, JIA = juvenile idiopathische Arthritis, EAA = Enthesitis-assoziierte Arthritis

#### 4.3.4.2 *Beschreibung der CD8<sup>+</sup>-Zellpopulation bezüglich Th1 und Th17-Charakteristika*

Die Zytokinproduktion der CD8<sup>+</sup>-Zellen war in der Patientengruppe zwar erhöht, jedoch ohne signifikanten Unterschied.

Der Anteil der CCR6<sup>+</sup> und der CCR6<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>-Zellen an CD8<sup>+</sup>-Zellen zeigte sich in der JIA-Gruppe signifikant vermehrt (vgl. Abbildung 18). In der CD161<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Subpopulation war die IFN $\gamma$ - und TNF $\alpha$ -Produktion in der Patientengruppe signifikant erhöht. In den anderen Subpopulationen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Zytokinproduktion (vgl. Tabelle 34).

Im deskriptiven Vergleich der JIA-Gruppe mit den beiden EAA-Patienten ließ sich in den CD8<sup>+</sup>-Zellen sowie den Subpopulationen eine deutlich gesteigerte IL-17-Produktion bei gleichzeitig vergleichsweise geringerem Anteil an CCR6<sup>+</sup>, CD161<sup>+</sup> und CCR6<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>-Zellen in der CD8<sup>+</sup>-Zellpopulation in den EAA-Probanden feststellen (vgl. Tabelle 34).

**Tabelle 34: Vergleich der Th1/Th17-Charakteristika in der CD8<sup>+</sup>-Zellpopulation bei Patienten und Kontrollen**

		HC	JIA	P-Wert	EAA
<b>Probanden-Anzahl</b>		<b>5</b>	<b>8</b>		<b>2</b>
<b>Gate</b>	<b>Sub-population</b>				
<b>CD8<sup>+</sup></b>	<b>IL-17<sup>+</sup></b>	0,58 ± 0,29 (0,60; 0,2-1,0)	1,10 ± 0,77 (0,95; 0,3-2,4)	0,284	3,30 ± 1,13 (3,30; 2,5-4,1)
	<b>IFN<math>\gamma</math><sup>+</sup></b>	13,06 ± 6,34 (10,90; 7,5-22,8)	21,39 ± 8,20 (21,05; 10,3-34,5)	0,127	18,50 ± 4,10 (18,50; 15,6-21,4)
	<b>TNF<math>\alpha</math><sup>+</sup></b>	2,50 ± 1,23 (1,90; 1,4-4,2)	4,54 ± 3,95 (3,70; 1,2-13,3)	0,435	6,65 ± 3,89 (6,65; 3,9-9,4)
<b>CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup></b>		1,82 ± 0,40 (1,60; 1,5-2,3)	4,68 ± 2,82 (3,85; 2,0-11,1)	<b>0,006</b>	4,65 ± 1,34 (4,65; 3,7-5,6)
	<b>IL-17<sup>+</sup></b>	3,42 ± 2,80 (3,20; 0,0-7,8)	5,03 ± 2,90 (4,70; 1,2-8,7)	0,524	7,10 ± 0,14 (7,10; 7,0-7,2)
	<b>IFN<math>\gamma</math><sup>+</sup></b>	26,18 ± 6,69 (24,20; 19,2-34,2)	27,03 ± 8,72 (25,40; 18,0-44,9)	0,833	30,25 ± 7,14 (30,25; 25,2-35,3)
	<b>TNF<math>\alpha</math><sup>+</sup></b>	14,80 ± 4,67 (14,40; 9,0-20,0)	10,26 ± 5,68 (9,30; 4,1-21,7)	0,127	13,05 ± 0,92 (13,05; 12,4-13,7)
<b>CD161<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup></b>		5,82 ± 3,04 (4,80; 3,4-10,7)	5,08 ± 5,01 (3,10; 1,4-16,4)	0,354	2,40 ± 1,41 (2,40; 1,4-3,4)
	<b>IL-17<sup>+</sup></b>	1,46 ± 0,84 (1,90; 0,5-2,3)	1,88 ± 1,34 (1,55; 0,3-3,7)	0,524	5,85 ± 3,89 (5,85; 3,1-8,6)
	<b>IFN<math>\gamma</math><sup>+</sup></b>	15,68 ± 6,54 (13,20; 10,2-25,9)	24,50 ± 7,54 (24,65; 13,6-39,7)	<b>0,045</b>	24,10 ± 0,00 (24,10; 24,1-24,1)
	<b>TNF<math>\alpha</math><sup>+</sup></b>	4,20 ± 1,75 (4,30; 1,9-6,7)	9,21 ± 4,41 (9,05; 4,1-17,6)	0,030	10,70 ± 0,57 (10,70; 10,3-11,1)
<b>CCR6<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup></b>		0,20 ± 0,17 (0,10; 0,1-0,5)	1,35 ± 2,31 (0,55; 0,1-7,0)	<b>0,045</b>	0,35 ± 0,07 (0,35; 0,3-0,4)
	<b>IL-17<sup>+</sup></b>	9,68 ± 13,84 (5,10; 0,0-33,3)	2,01 ± 2,66 (0,85; 0,0-7,4)	0,435	9,10 ± 12,87 (9,10; 0,0-18,2)
	<b>IFN<math>\gamma</math><sup>+</sup></b>	11,40 ± 12,60 (10,30; 0,0-30,0)	19,75 ± 9,46 (18,25; 8,6-38,5)	0,222	17,00 ± 1,70 (17,00; 15,8-18,2)
	<b>TNF<math>\alpha</math><sup>+</sup></b>	10,66 ± 15,32 (0,00; 0,0-33,3)	9,59 ± 5,55 (8,40; 2,9-16,7)	0,622	17,00 ± 1,70 (17,00; 15,8-18,2)

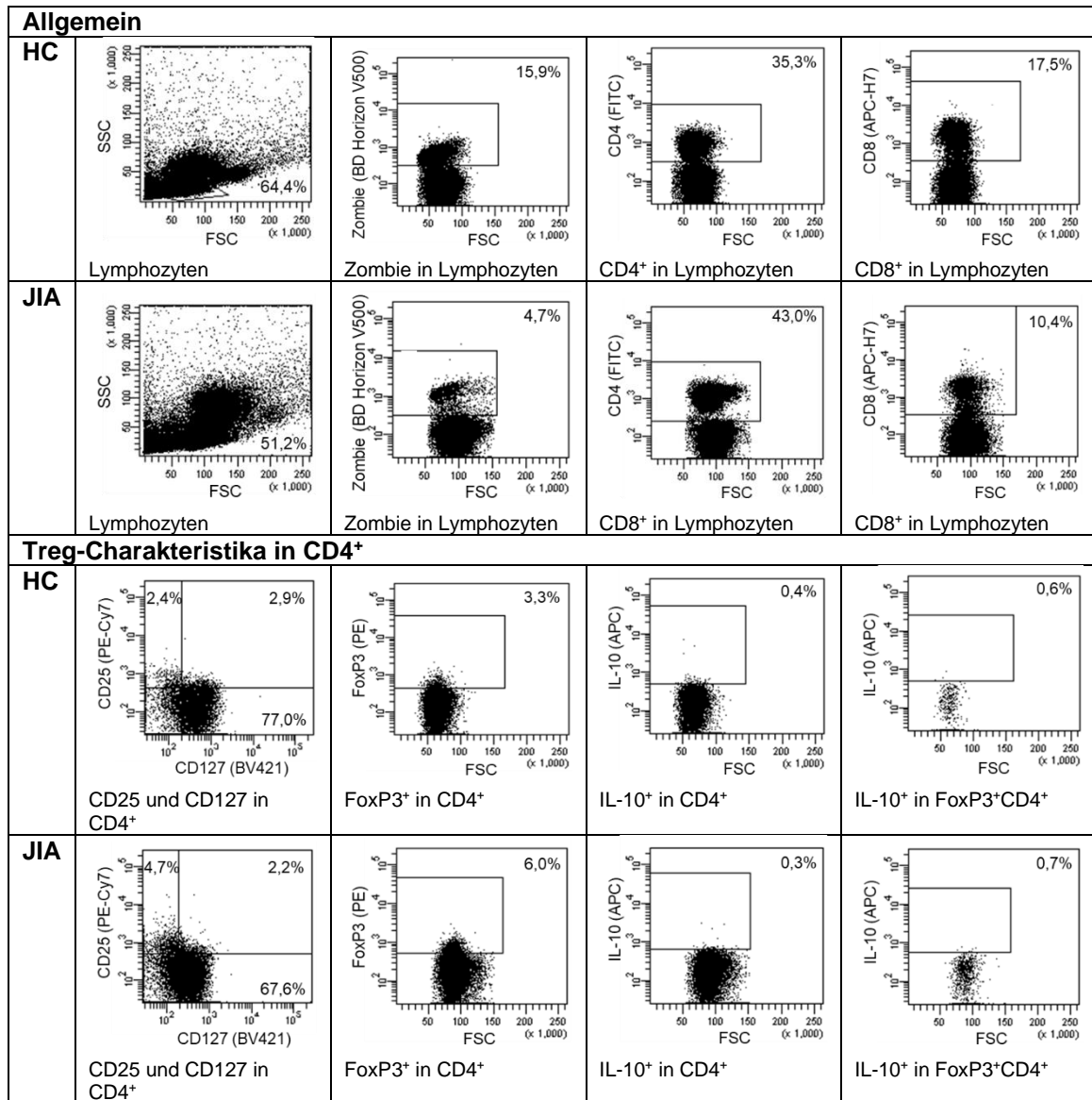
Werte in % anteilig an jeweiliger Lymphozytenpopulation. Angaben in Mittelwert ± Standardabweichung (Median; Minimum-Maximum)  
P-Wert-Angabe als Vergleich HC mit JIA (Mann-Whitney-U Test). Signifikanz: p<0,05 (fett)  
HC = Healthy Control, JIA = juvenile idiopathische Arthritis, EAA = Enthesitis-assoziierte Arthritis

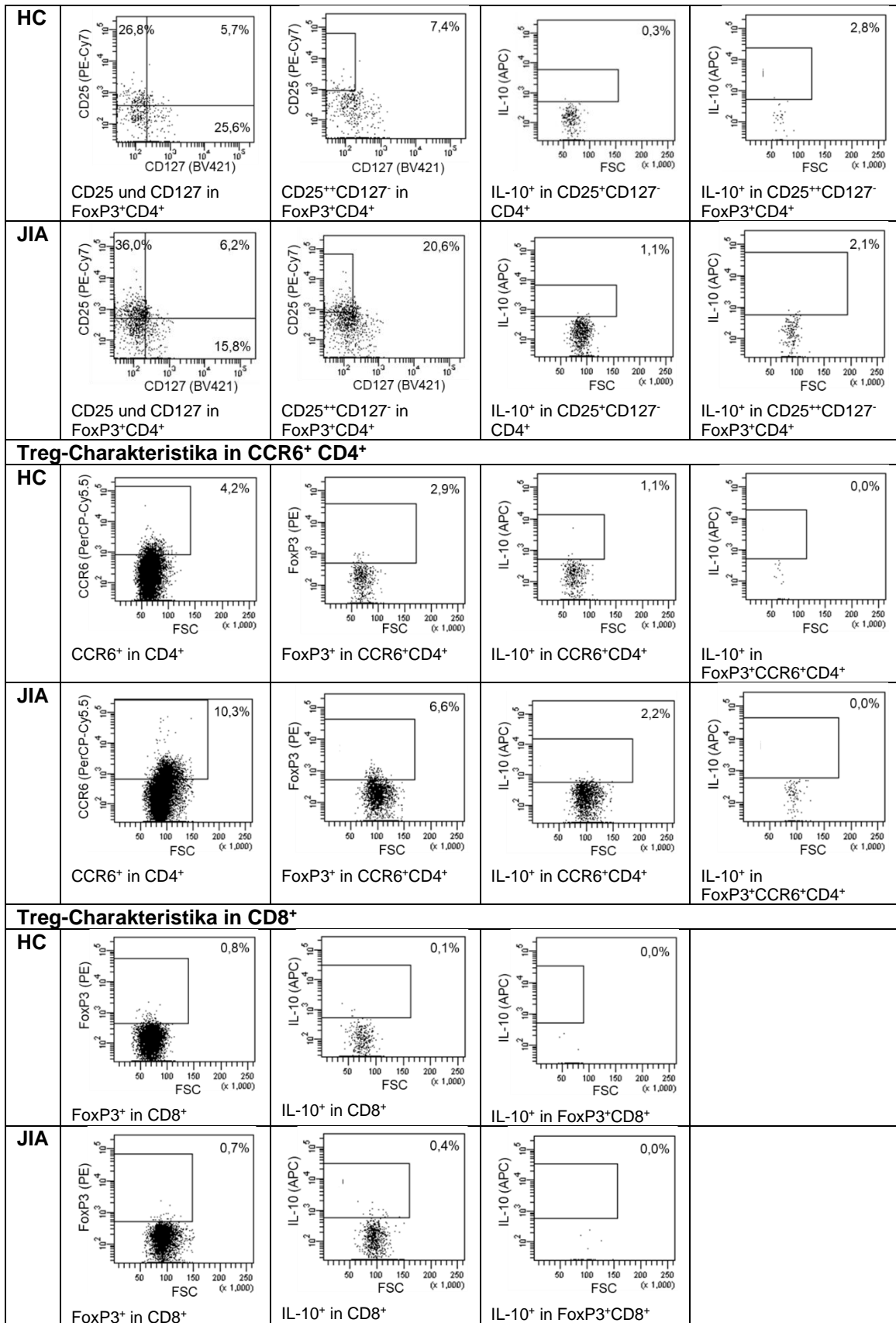


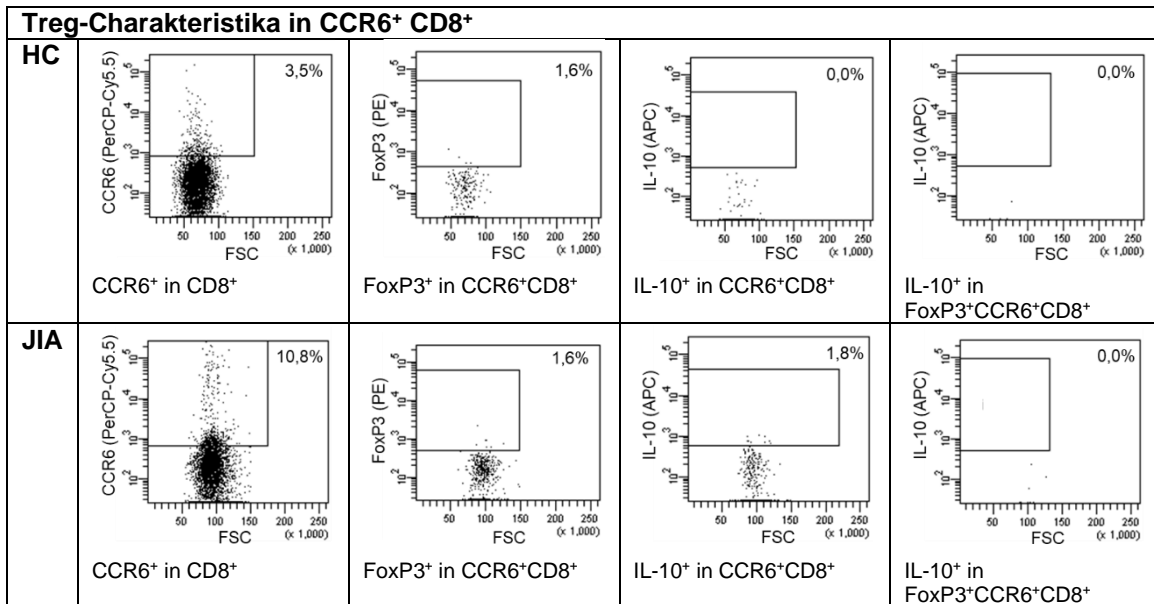
### 4.3.5 Analyse der Tregs im Lymphozytenpool

Die Analyse der Tregs im Lymphozytenpool wird im Folgenden sowohl deskriptiv als auch hinsichtlich ihrer Signifikanz dargestellt. In Tabelle 35 wird zunächst das Beispielgating je einer gesunden Kontrolle und eines JIA-Patienten abgebildet.

**Tabelle 35: PBMC-Charakterisierung der Tregs im Lymphozytenpool einer gesunden Kontrolle (HC) und eines Patienten (JIA)**





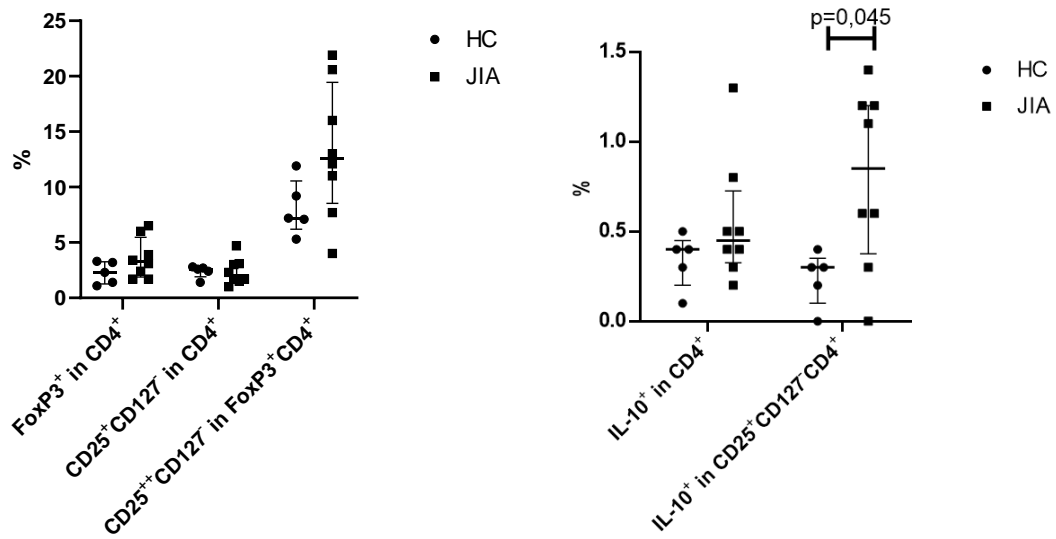


Prozentangaben der Anteile an den jeweiligen Subpopulationen  
 Nach dem Zombie-Gating (= Ausschluss der toten Zellen) wurden alle Gates in der lebendigen Lymphozytenpopulation (entspricht Nicht-Zombie) gesetzt.

#### 4.3.5.1 Treg-Charakteristika der CD4<sup>+</sup>-Zellen

Beim Vergleich der Patienten- mit der Kontrollgruppe zeigte sich in der Patientengruppe ein vermehrter Anteil an Treg-charakteristischen Merkmalen in den CD4<sup>+</sup>-Zellen, jedoch war dieser Unterschied lediglich für die IL-10-Produktion in Tregs (CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>) signifikant.

Bei der deskriptiven Betrachtung der Patientenuntergruppen zeigten sich T-Zellen mit Treg-Phänotyp in der JIA-Gruppe gegenüber den EAA-Patienten erhöht. Lediglich die IL-10<sup>+</sup>-Zellen in CD4<sup>+</sup>- und Treg-Zellen waren in EAA-Patienten höher als in der JIA-Kohorte (vgl. Tabelle 36, Abbildung 19).



**Abbildung 19: Treg-Charakteristika in CD4<sup>+</sup>-Zellen**

Darstellung in % mit Median und Interquartilrange. Oberhalb der eckigen Klammern sind die signifikanten P-Werte ( $p < 0,05$ ) abgebildet. HC = Healthy Control, JIA = juvenile idiopathische Arthritis

**Tabelle 36: Vergleich der Treg-Charakteristika der CD4<sup>+</sup>-Zellen bei Kontroll- und Patientenkohorte**

	HC	JIA	P-Wert	EAA
<b>Probanden-Anzahl</b>	<b>5</b>	<b>8</b>		<b>2</b>
<b>Subpopulation in entsprechendem Gate</b>				
<b>FoxP3<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup></b>	2,26 ± 1,01 (2,30; 1,1-3,3)	3,59 ± 1,82 (3,25; 1,7-6,5)	0,171	3,15 ± 0,21 (3,15; 3,0-3,3)
<b>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> in CD4<sup>+</sup></b>	2,38 ± 0,57 (2,60; 1,4-2,8)	2,37 ± 1,19 (2,00; 1,0-4,7)	0,943	1,65 ± 0,49 (1,65; 1,3-2,0)
<b>CD25<sup>++</sup>CD127<sup>-</sup> in FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></b>	8,14 ± 2,51 (7,20; 5,3-11,9)	13,29 ± 6,09 (12,55; 4,0-21,9)	0,093	5,95 ± 3,04 (5,95; 3,8-8,1)
<b>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> in FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></b>	24,00 ± 4,83 (22,40; 18,5-30,8)	24,94 ± 10,79 (24,45; 8,3-41,2)	1,000	14,80 ± 0,28 (14,80; 14,6-15,0)
<b>IL-10<sup>+</sup> in CD25<sup>++</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></b>	0,44 ± 0,98 (0,00; 0,0-2,2)	1,41 ± 1,65 (1,05; 0,0-4,3)	0,354	1,30 ± 1,84 (1,30; 0,0-2,6)
<b>IL-10<sup>+</sup> in FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></b>	0,60 ± 0,41 (0,60; 0,0-1,1)	0,94 ± 0,71 (0,85; 0,0-2,4)	0,435	0,45 ± 0,07 (0,45; 0,4-0,5)
<b>IL-10<sup>+</sup> in CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup></b>	0,24 ± 0,15 (0,30; 0,0-0,4)	0,80 ± 0,50 (0,85; 0,0-1,4)	<b>0,045</b>	1,40 ± 1,98 (1,40; 0,0-2,8)
<b>IL-10<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup></b>	0,34 ± 0,15 (0,40; 0,1-0,5)	0,55 ± 0,35 (0,45; 0,20-1,30)	0,284	0,70 ± 0,14 (0,70; 0,6-0,8)

Werte in % anteilig an jeweiliger Lymphozytenpopulation. Angaben in Mittelwert ± Standardabweichung (Median; Minimum-Maximum)

P-Wert-Angabe als Vergleich HC mit JIA (Mann-Whitney-U Test). Signifikanz: p<0,05 (fett)

HC = Healthy Control, JIA = juvenile idiopathische Arthritis, EAA = Enthesitis-assoziierte Arthritis

#### 4.3.5.2 Treg-Charakteristika der CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen

Wie bereits in der Analyse der Th1/Th17-Balance sichtbar (vgl. Kapitel 4.3.4.1), war auch in dieser Färbung eine signifikante CCR6-Expressionssteigerung auf CD4<sup>+</sup>-Zellen in der Patientengruppe verglichen mit der Kontrollgruppe erkennbar.

Die IL-10<sup>+</sup>- und FoxP3<sup>+</sup>-Zellen in dieser Subpopulation der CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen war jeweils in der JIA-Gruppe deutlich, jedoch nicht signifikant erhöht.

Im deskriptiven Vergleich der EAA-Proben mit der JIA-Gruppe zeigte sich auch hier eine erniedrigte CCR6-Expression und eine leicht gesteigerte IL-10-Produktion in den CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen (vgl. Tabelle 37).

**Tabelle 37: Treg-Charakteristika der CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen**

	HC	JIA	P-Wert	EAA
<b>Probanden-Anzahl</b>	<b>5</b>	<b>8</b>		<b>2</b>
<b>Subpopulation in entsprechendem Gate</b>				
<b>CCR6<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup></b>	1,76 ± 1,43 (1,20; 0,6-4,2)	7,39 ± 4,10 (6,65; 0,9-15,1)	<b>0,019</b>	2,20 ± 0,85 (2,20; 1,6-2,8)
<b>IL-10<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></b>	0,82 ± 0,37 (0,70; 0,40-1,30)	1,28 ± 0,63 (1,50; 0,40-2,20)	0,171	1,90 ± 0,42 (1,90; 1,6-2,2)
<b>FoxP3<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></b>	2,70 ± 1,85 (2,90; 0,00-5,10)	5,54 ± 2,72 (6,50; 1,30-9,60)	0,093	4,65 ± 0,35 (4,65; 4,4-4,9)
<b>IL-10<sup>+</sup> in FoxP3<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></b>	0,00 ± 0,00 (0,00; 0,0-0,0)	0,70 ± 1,32 (0,00; 0,0-3,3)	0,524	0,00 ± 0,00 (0,00; 0,0-0,0)

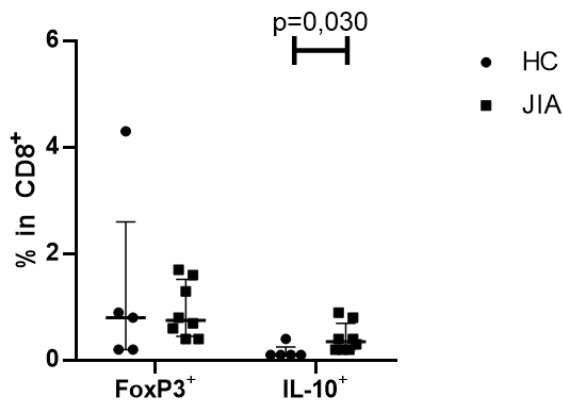
Werte in % anteilig an jeweiliger Lymphozytenpopulation. Angaben in Mittelwert ± Standardabweichung (Median; Minimum-Maximum)  
P-Wert-Angabe als Vergleich HC mit JIA (Mann-Whitney-U Test). Signifikanz: p<0,05 (fett)  
HC = Healthy Control, JIA = juvenile idiopathische Arthritis, EAA = Enthesitis-assoziierte Arthritis

#### 4.3.5.3 Treg-Charakteristika der CD8<sup>+</sup>-Zellen und CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen

In der Analyse der CD8<sup>+</sup>-Zellen hinsichtlich der Treg-Charakteristika fielen zum einen ein signifikant höherer Anteil an IL-10<sup>+</sup>-Zellen in der Patientengruppe gegenüber der Kontrollgruppe auf.

Zum anderen war, wie bereits in Panel 2 festgestellt, auch der Anteil an CCR6<sup>+</sup>-Zellen in der JIA-Kohorte signifikant erhöht. In der Subpopulation der CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen war die IL-10-Produktion bei den Patientenproben ebenfalls signifikant höher.

Im deskriptiven Vergleich der JIA- mit der EAA-Gruppe ließ sich eine erhöhte FoxP3<sup>+</sup>-Expression, jedoch eine verringerte IL-10-Produktion in FoxP3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen in den EAA-Proben feststellen (vgl. Abbildung 20, Tabelle 38).



**Abbildung 20: Treg-Charakteristika in CD8<sup>+</sup>-Zellen**

Darstellung in % mit Median und Interquartilrange. Oberhalb der eckigen Klammern sind die signifikanten P-Werte ( $p < 0,05$ ) abgebildet. HC = Healthy Control, JIA = juvenile idiopathische Arthritis

**Tabelle 38: Vergleich der Treg-Charakteristika der CD8<sup>+</sup>- und CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Zellen bei Kontroll- und Patientenkohorte**

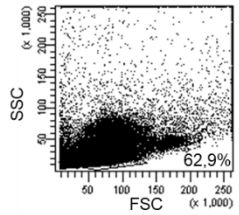
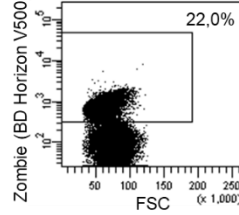
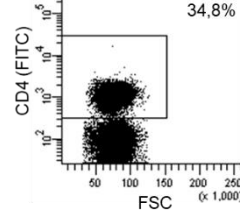
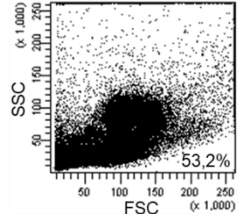
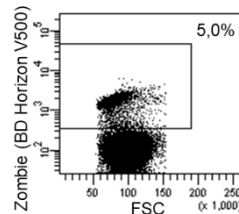
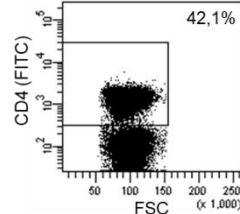
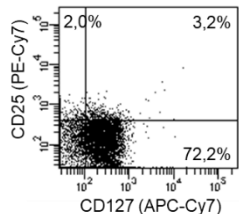
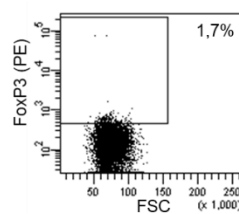
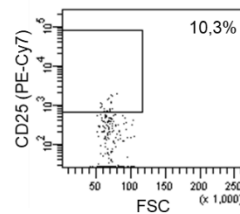
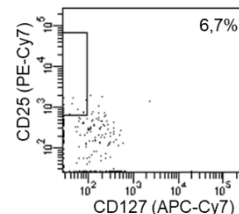
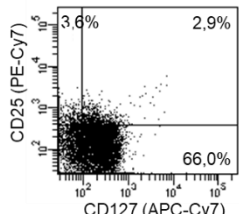
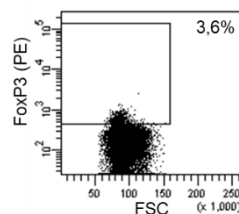
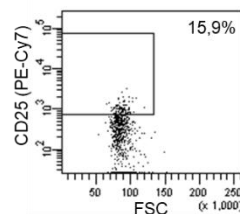
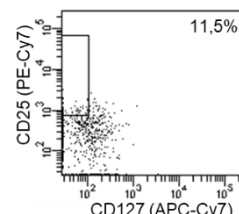
	HC	JIA	P-Wert	EAA
<b>Probanden-Anzahl</b>	<b>5</b>	<b>8</b>		<b>2</b>
<b>Subpopulation in entsprechendem Gate</b>				
<b>FoxP3<sup>+</sup> in CD8<sup>+</sup></b>	1,28 ± 1,72 (0,80; 0,2-4,3)	0,94 ± 0,52 (0,75; 0,4-1,7)	0,724	2,05 ± 0,07 (2,05; 2,0-2,1)
<b>IL-10<sup>+</sup> in CD8<sup>+</sup></b>	0,16 ± 0,13 (0,10; 0,1-0,4)	0,43 ± 0,28 (0,35; 0,2-0,9)	<b>0,030</b>	0,60 ± 0,57 (0,60; 0,2-1,0)
<b>CCR6<sup>+</sup> in CD8<sup>+</sup></b>	2,94 ± 0,71 (3,30; 1,8-3,5)	5,46 ± 2,79 (4,75; 2,2-10,8)	<b>0,019</b>	4,45 ± 1,20 (4,45; 3,6-5,3)
<b>FoxP3<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup></b>	2,30 ± 1,90 (1,60; 0,5-5,4)	2,38 ± 1,74 (2,30; 0,0-5,0)	1,000	3,35 ± 0,64 (3,35; 2,9-3,8)
<b>IL-10<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup></b>	0,42 ± 0,38 (0,70; 0,0-0,7)	3,53 ± 1,94 (3,20; 1,7-7,0)	<b>0,002</b>	3,35 ± 2,05 (3,35; 1,9-4,8)
<b>IL-10<sup>+</sup> in FoxP3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup></b>	0,66 ± 1,09 (0,00; 0,0-2,5)	1,54 ± 1,59 (1,45; 0,0-4,3)	0,345	0,40 ± 0,57 (0,40; 0,0-0,8)
<b>IL-10<sup>+</sup> in FoxP3<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup></b>	0,00 ± 0,00 (0,00; 0,0-0,0)	3,04 ± 5,63 (0,00; 0,0-12,5)	0,524	0,00 ± 0,00 (0,00; 0,0-0,0)

Werte in % anteilig an jeweiliger Lymphozytenpopulation. Angaben in Mittelwert ± Standardabweichung (Median; Minimum-Maximum)  
P-Wert-Angabe als Vergleich HC mit JIA (Mann-Whitney-U Test). Signifikanz:  $p < 0,05$  (fett)  
HC = Healthy Control, JIA = juvenile idiopathische Arthritis, EAA = Enthesitis-assoziierte Arthritis

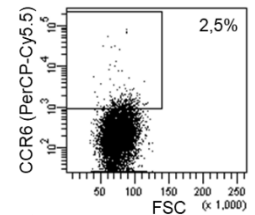
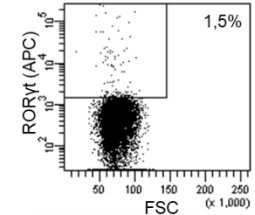
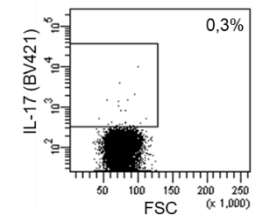
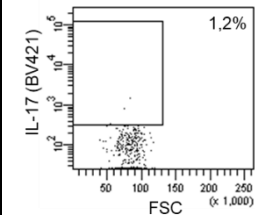
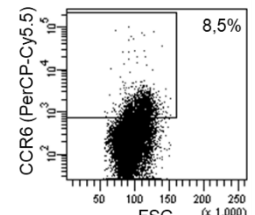
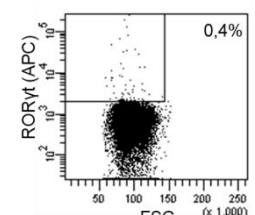
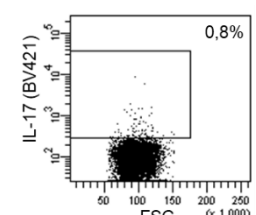
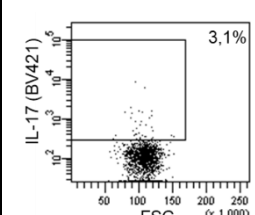
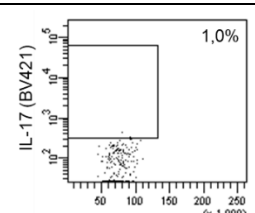
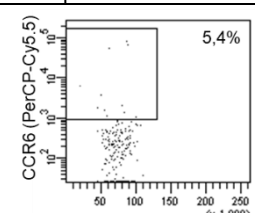
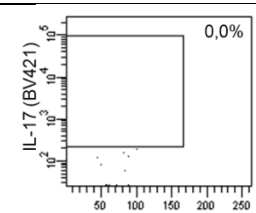
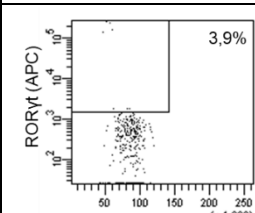
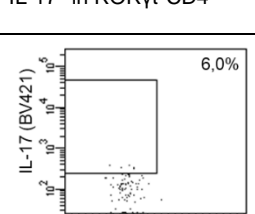
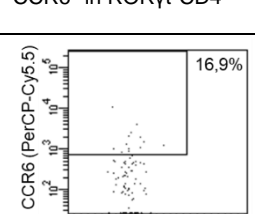
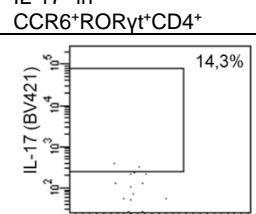
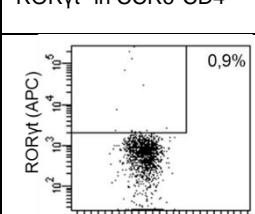
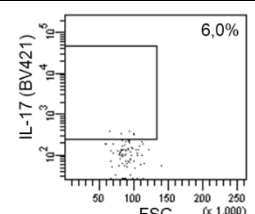
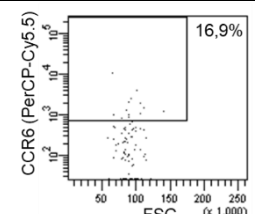
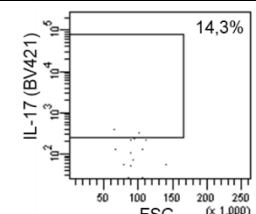
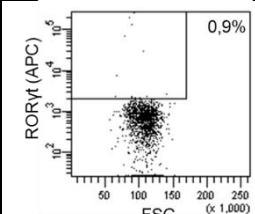
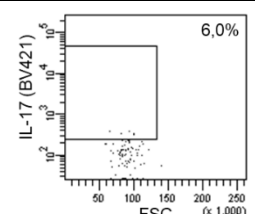
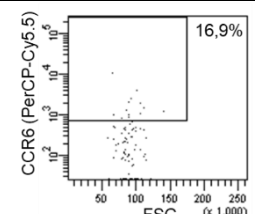
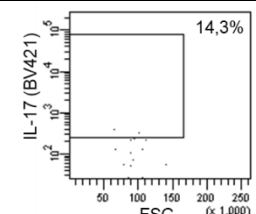
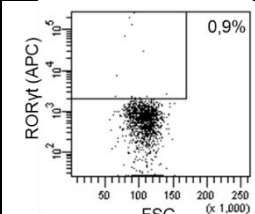
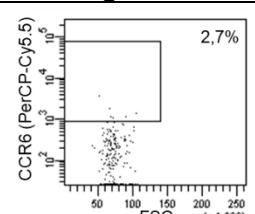
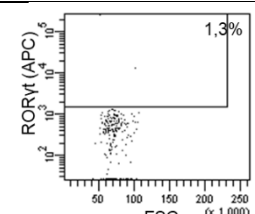
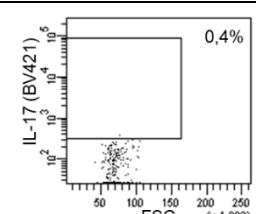
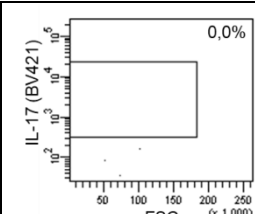
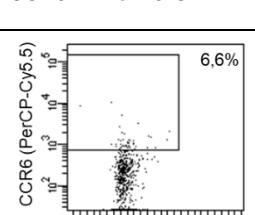
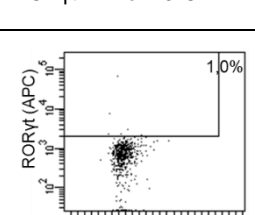
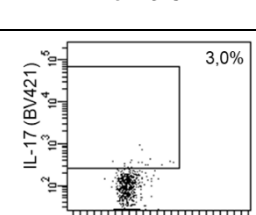
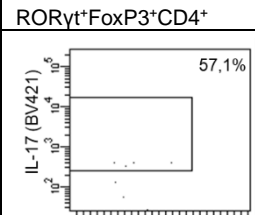
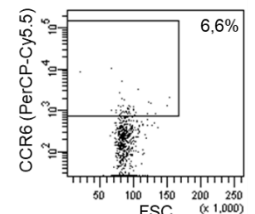
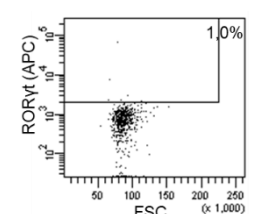
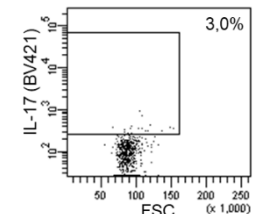
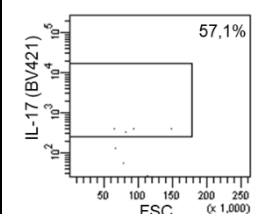
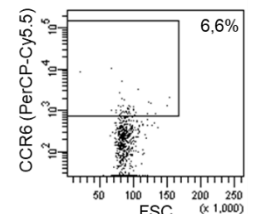
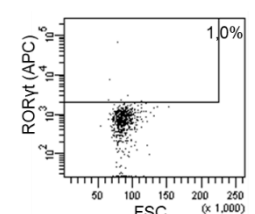
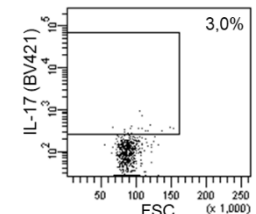
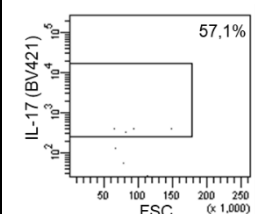
### 4.3.6 Analyse der Treg/Th17-Balance

In den folgenden Unterkapiteln findet sich die Auswertung des Panels zur Treg/Th17-Differenzierung. Die Charakteristika und statistischen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen werden im Folgenden dargestellt. In Tabelle 39 wird das Beispielgating je einer gesunden Kontrolle und eines JIA-Patienten gezeigt.

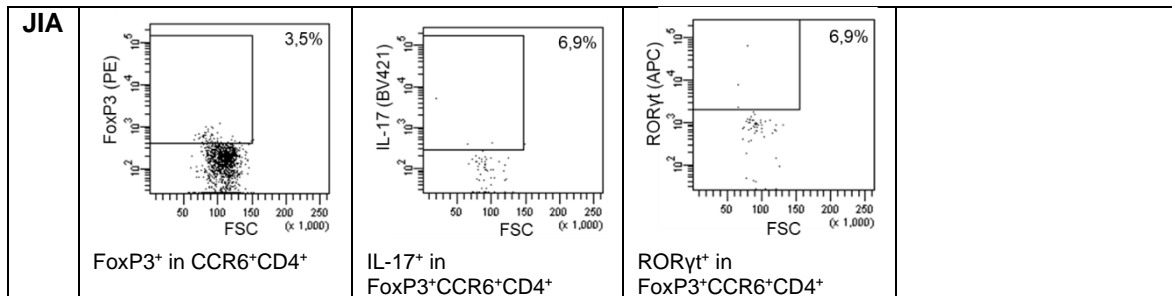
**Tabelle 39: PBMC-Charakterisierung der Tregs/Th17-Balance im Lymphozytenpool einer gesunden Kontrolle (HC) und eines Patienten (JIA)**

<b>Allgemein</b>				
<b>HC</b>	 <p>SSC (x 1,000) FSC (x 1,000) 62,9%</p> <p>Lymphozyten</p>	 <p>Zombie (BD Horizon V500) FSC (x 1,000) 22,0%</p> <p>Zombie in Lymphozyten</p>	 <p>CD4 (FITC) FSC (x 1,000) 34,8%</p> <p>CD4<sup>+</sup> in Lymphozyten</p>	
<b>JIA</b>	 <p>SSC (x 1,000) FSC (x 1,000) 53,2%</p> <p>Lymphozyten</p>	 <p>Zombie (BD Horizon V500) FSC (x 1,000) 5,0%</p> <p>Zombie in Lymphozyten</p>	 <p>CD4 (FITC) FSC (x 1,000) 42,1%</p> <p>CD4<sup>+</sup> in Lymphozyten</p>	
<b>Treg-Charakteristika in CD4<sup>+</sup></b>				
<b>HC</b>	 <p>CD25 (PE-Cy7) CD127 (APC-Cy7) 72,2% 2,0% 3,2%</p> <p>CD25 und CD127 in CD4<sup>+</sup></p>	 <p>FoxP3 (PE) FSC (x 1,000) 1,7%</p> <p>FoxP3<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup></p>	 <p>CD25 (PE-Cy7) FSC (x 1,000) 10,3%</p> <p>CD25<sup>++</sup> in FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	 <p>CD25 (PE-Cy7) CD127 (APC-Cy7) 6,7% 66,0%</p> <p>CD25<sup>++</sup>CD127<sup>-</sup> in FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>
<b>JIA</b>	 <p>CD25 (PE-Cy7) CD127 (APC-Cy7) 66,0% 3,6% 2,9%</p> <p>CD25 und CD127 in CD4<sup>+</sup></p>	 <p>FoxP3 (PE) FSC (x 1,000) 3,6%</p> <p>FoxP3<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup></p>	 <p>CD25 (PE-Cy7) FSC (x 1,000) 15,9%</p> <p>CD25<sup>++</sup> in FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	 <p>CD25 (PE-Cy7) CD127 (APC-Cy7) 11,5% 66,0%</p> <p>CD25<sup>++</sup>CD127<sup>-</sup> in FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>



Th17-Charakteristika in CD4 <sup>+</sup>				
HC	 CCR6 <sup>+</sup> in CD4 <sup>+</sup>	 RORγt <sup>+</sup> in CD4 <sup>+</sup>	 IL-17 <sup>+</sup> in CD4 <sup>+</sup>	 IL-17 <sup>+</sup> in CCR6 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>
	 CCR6 <sup>+</sup> in CD4 <sup>+</sup>	 RORγt <sup>+</sup> in CD4 <sup>+</sup>	 IL-17 <sup>+</sup> in CD4 <sup>+</sup>	 IL-17 <sup>+</sup> in CCR6 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>
HC	 IL-17 <sup>+</sup> in RORγt <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	 CCR6 <sup>+</sup> in RORγt <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	 IL-17 <sup>+</sup> in CCR6 <sup>+</sup> RORγt <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	 RORγt <sup>+</sup> in CCR6 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>
	 IL-17 <sup>+</sup> in RORγt <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	 CCR6 <sup>+</sup> in RORγt <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	 IL-17 <sup>+</sup> in CCR6 <sup>+</sup> RORγt <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	 RORγt <sup>+</sup> in CCR6 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>
JIA	 IL-17 <sup>+</sup> in RORγt <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	 CCR6 <sup>+</sup> in RORγt <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	 IL-17 <sup>+</sup> in CCR6 <sup>+</sup> RORγt <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	 RORγt <sup>+</sup> in CCR6 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>
	 IL-17 <sup>+</sup> in RORγt <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	 CCR6 <sup>+</sup> in RORγt <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	 IL-17 <sup>+</sup> in CCR6 <sup>+</sup> RORγt <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	 RORγt <sup>+</sup> in CCR6 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>
Th17 like Tregs in CD4 <sup>+</sup>				
HC	 CCR6 <sup>+</sup> in FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	 RORγt <sup>+</sup> in FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	 IL-17 <sup>+</sup> in FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	 IL-17 <sup>+</sup> in RORγt <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>
	 CCR6 <sup>+</sup> in FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	 RORγt <sup>+</sup> in FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	 IL-17 <sup>+</sup> in FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	 IL-17 <sup>+</sup> in RORγt <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>
JIA	 CCR6 <sup>+</sup> in FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	 RORγt <sup>+</sup> in FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	 IL-17 <sup>+</sup> in FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	 IL-17 <sup>+</sup> in RORγt <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>
	 CCR6 <sup>+</sup> in FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	 RORγt <sup>+</sup> in FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	 IL-17 <sup>+</sup> in FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	 IL-17 <sup>+</sup> in RORγt <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>

<b>HC</b>	<p>CCR6<sup>+</sup> in RORγt<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	<p>IL-17<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>RORγt<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	<p>IL-17<sup>+</sup> in CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	<p>RORγt<sup>+</sup> in CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>
<b>JIA</b>	<p>CCR6<sup>+</sup> in RORγt<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	<p>IL-17<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>RORγt<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	<p>IL-17<sup>+</sup> in CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	<p>RORγt<sup>+</sup> in CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>
<b>HC</b>	<p>IL-17<sup>+</sup> in CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	<p>RORγt<sup>+</sup> in CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	<p>FoxP3<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>RORγt<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	<p>FoxP3<sup>+</sup> in RORγt<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>
<b>JIA</b>	<p>IL-17<sup>+</sup> in CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	<p>RORγt<sup>+</sup> in CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	<p>FoxP3<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>RORγt<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	<p>FoxP3<sup>+</sup> in RORγt<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>
<b>HC</b>	<p>FoxP3<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	<p>IL-17<sup>+</sup> in FoxP3<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	<p>RORγt<sup>+</sup> in FoxP3<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	



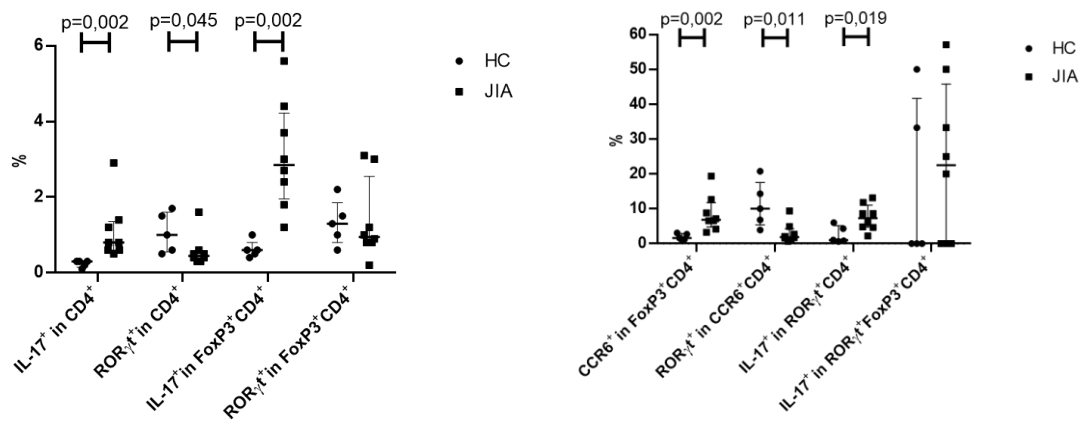
Prozentangaben der Anteile an den jeweiligen Subpopulationen  
 Nach dem Zombie-Gating (= Ausschluss der toten Zellen) wurden alle Gates in der lebendigen Lymphozytenpopulation (entspricht Nicht-Zombie) gesetzt.

#### 4.3.6.1 *Th17-Charakteristika der CD4<sup>+</sup>-Zellen und FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen*

Bereits in der Analyse der Th1/Th17-Balance (vgl. Kapitel 4.3.4) wurden die signifikanten Unterschiede bzgl. der CCR6-Expression und IL-17-Produktion innerhalb der CD4<sup>+</sup>-Population zwischen Patienten- und Kontrollgruppe, sowie eine erhöhte IL-17-Produktion dieser Population in den EAA-Patienten verglichen mit der JIA-Kohorte dargestellt.

In der Analyse der Treg/Th17-Balance zeigte die JIA-Gruppe signifikant höhere Anteile der IL-17<sup>+</sup> beziehungsweise CCR6<sup>+</sup> in FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollen (vgl. auch die in Kapitel 4.3.5.2 beschriebene erhöhte FoxP3<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation bei JIA-Patienten). Die Expression von RORyt in CD4<sup>+</sup> und CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> war in der JIA-Gruppe signifikant vermindert, wohingegen die IL-17-Produktion in RORyt<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen in den Patienten vermehrt war (vgl. Abbildung 21).

Im deskriptiven Vergleich der EAA-Patienten mit der JIA-Gruppe zeigte sich eine erhöhte IL-17-Produktion innerhalb der einzelnen Subpopulationen der EAA-Gruppe (vgl. Tabelle 40).



**Abbildung 21: Th17- und Treg-Balance der CD4<sup>+</sup>-Zellen in Kontroll- und Patientenkohorte**

Darstellung in % mit Median und Interquartilrange. Oberhalb der eckigen Klammern sind die signifikanten P-Werte ( $p < 0,05$ ) abgebildet. HC = Healthy Control, JIA = juvenile idiopathische Arthritis

**Tabelle 40: Vergleich der Th17- und Treg-Balance der CD4<sup>+</sup>-Zellen bei Kontroll- und Patientenkohorte**

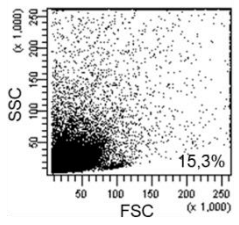
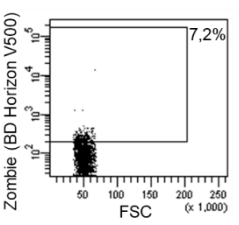
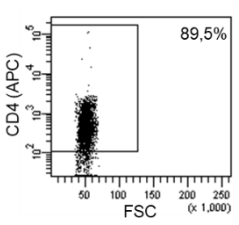
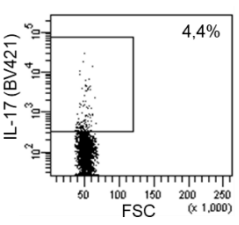
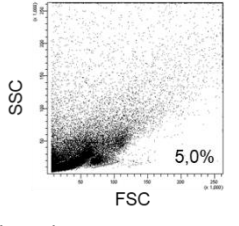
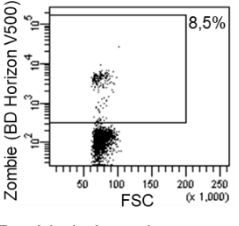
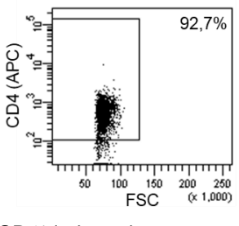
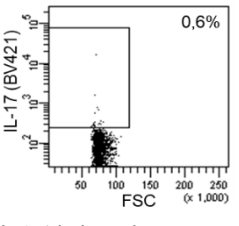
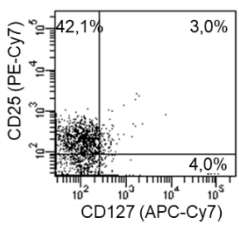
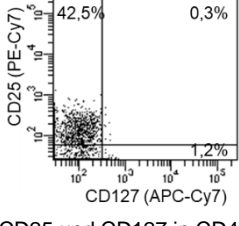
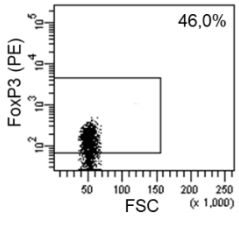
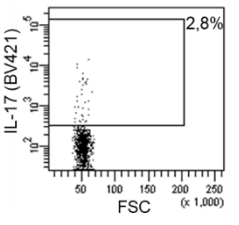
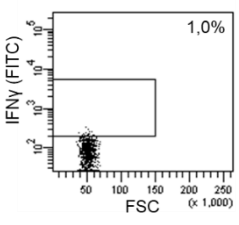
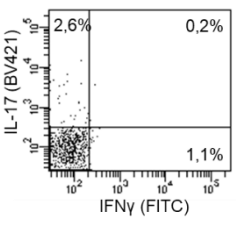
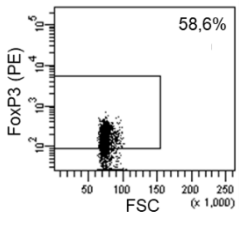
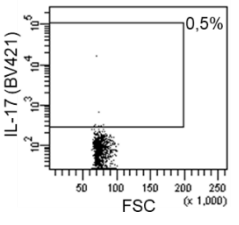
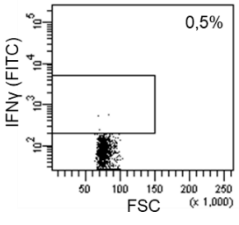
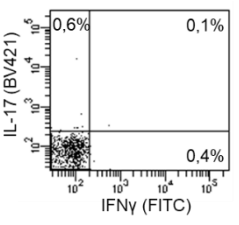
	HC	JIA	P-Wert	EAA
<b>Probanden-Anzahl</b>	<b>5</b>	<b>8</b>		<b>2</b>
<b>Subpopulation in entsprechendem Gate</b>				
<b>IL-17<sup>+</sup> in FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></b>	0,62 ± 0,23 (0,60; 0,4-1,0)	3,10 ± 1,43 (2,85; 1,2-5,6)	<b>0,002</b>	6,60 ± 2,83 (6,60; 4,6-8,6)
<b>CCR6<sup>+</sup> in FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></b>	1,92 ± 0,93 (1,60; 1,0-3,1)	8,60 ± 5,22 (6,90; 3,3-19,4)	<b>0,002</b>	3,65 ± 0,35 (3,65; 3,4-3,9)
<b>RORyt<sup>+</sup> in FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></b>	1,32 ± 0,60 (1,30; 0,6-2,2)	1,38 ± 1,07 (0,95; 0,2-3,1)	0,622	1,10 ± 0,00 (1,10; 1,1-1,1)
<b>IL-17<sup>+</sup> in RORyt<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></b>	16,66 ± 23,56 (0,00; 0,0-50,0)	23,17 ± 22,67 (22,50; 0,0-57,1)	0,622	25,00 ± 35,36 (25,00; 0,0-50,0)
<b>IL-17<sup>+</sup> in CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></b>	0,00 ± 0,00 (0,00; 0,0-0,0)	0,20 ± 0,57 (0,00; 0,0-1,6)	0,724	0,00 ± 0,00 (0,00; 0,0-0,0)
<b>RORyt<sup>+</sup> in CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></b>	1,74 ± 2,90 (0,00; 0,0-6,7)	0,30 ± 0,85 (0,00; 0,0-2,4)	0,435	0,00 ± 0,00 (0,00; 0,0-0,0)
<b>IL-17<sup>+</sup> in FoxP3<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></b>	17,48 ± 13,12 (20,00; 0,0-33,3)	10,03 ± 11,48 (6,90; 0,0-36,4)	0,354	13,50 ± 12,30 (13,50; 4,8-22,2)
<b>RORyt<sup>+</sup> in FoxP3<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></b>	19,62 ± 13,33 (25,00; 0,0-33,3)	6,54 ± 5,99 (4,25; 1,7-18,2)	0,171	7,95 ± 4,45 (7,95; 4,8-11,1)
<b>RORyt<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></b>	11,16 ± 6,63 (10,00; 3,9-20,8)	3,00 ± 2,90 (1,90; 0,7-9,4)	<b>0,011</b>	4,40 ± 1,84 (4,40; 3,1-5,7)
<b>IL-17<sup>+</sup> in RORyt<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></b>	2,54 ± 2,46 (1,00; 0,6-6,0)	7,48 ± 3,74 (7,30; 2,2-13,1)	<b>0,019</b>	11,15 ± 8,84 (11,15; 4,9-17,4)
<b>RORyt<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup></b>	1,06 ± 0,53 (1,00; 0,5-1,7)	0,58 ± 0,43 (0,45; 0,3-1,6)	<b>0,045</b>	0,50 ± 0,14 (0,50; 0,4-0,6)

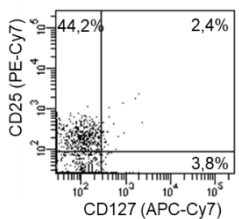
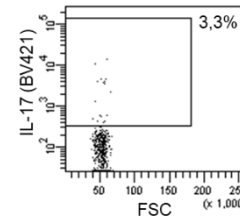
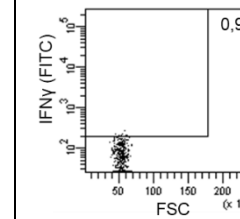
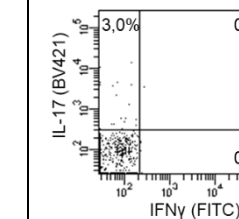
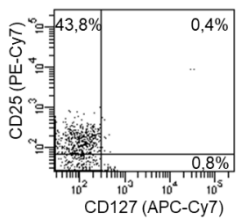
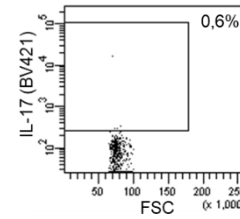
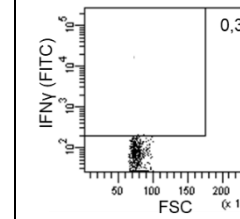
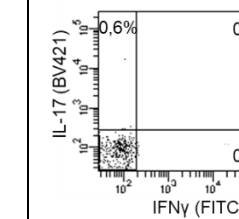
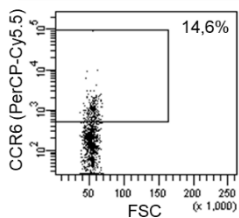
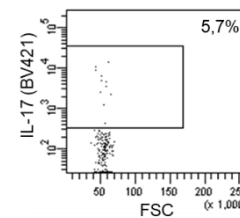
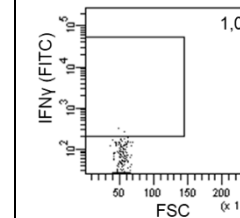
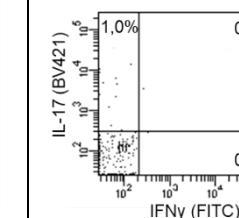
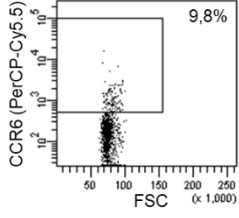
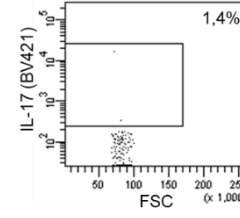
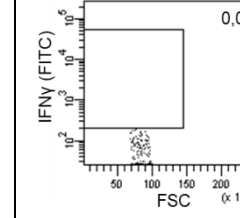
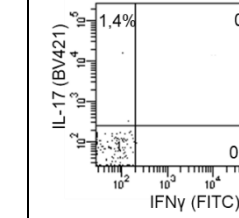
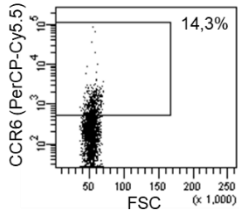
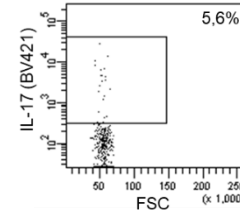
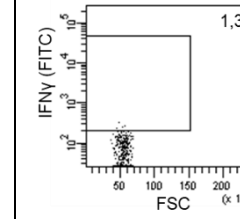
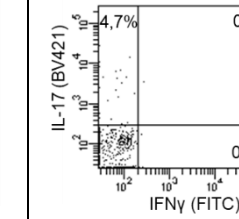
Werte in % anteilig an jeweiliger Lymphozytenpopulation. Angaben in Mittelwert ± Standardabweichung (Median; Minimum-Maximum)  
P-Wert-Angabe als Vergleich HC mit JIA (Mann-Whitney-U Test). Signifikanz: p<0,05 (fett)  
HC = Healthy Control, JIA = juvenile idiopathische Arthritis, EAA = Enthesitis-assoziierte Arthritis

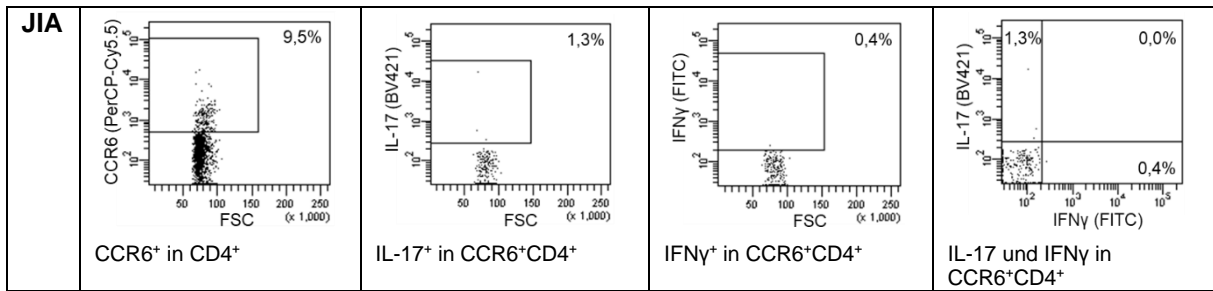
#### 4.4 Treg-Charakterisierung

Das Kapitel der Treg-Charakterisierung gliedert sich zunächst in eine Darstellung der für diese Versuche verwendeten Probanden, dann in die Betrachtung der Ergebnisse je in JIA- und Kontrollgruppe und abschließend in den Vergleich der beiden Gruppen miteinander. In Tabelle 41 wird zuvor das Beispielgating für je eine gesunde Kontrolle und einen JIA-Patienten für die jeweiligen Stimuli gezeigt.

**Tabelle 41: Treg-Charakterisierung einer gesunden Kontrolle (HC) und eines Patienten (JIA)**

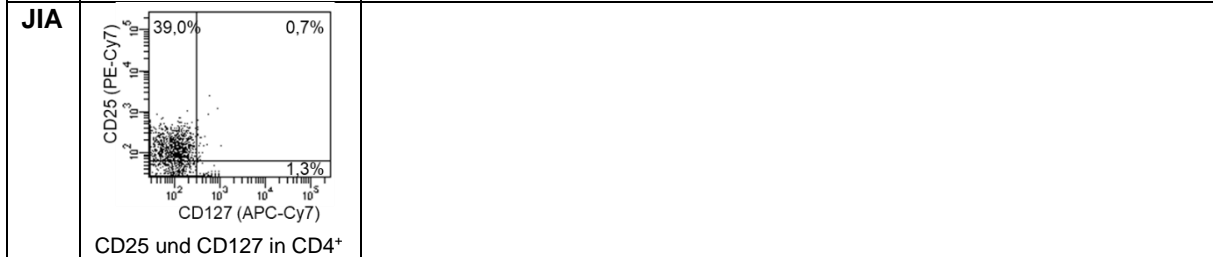
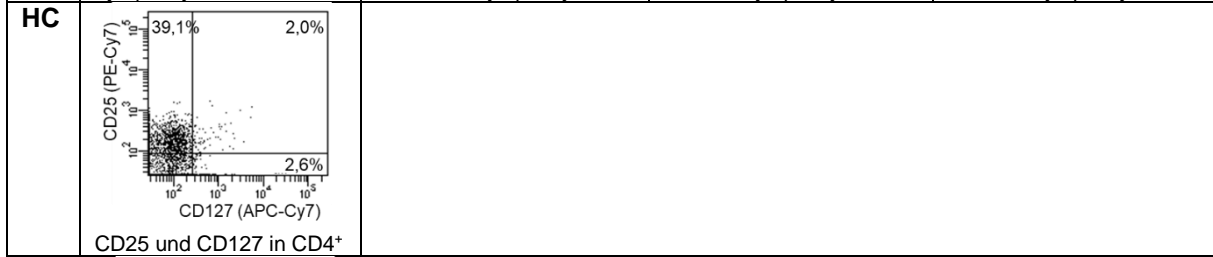
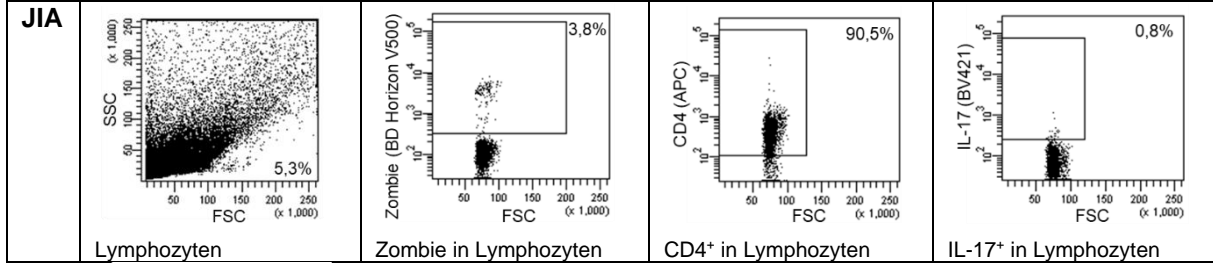
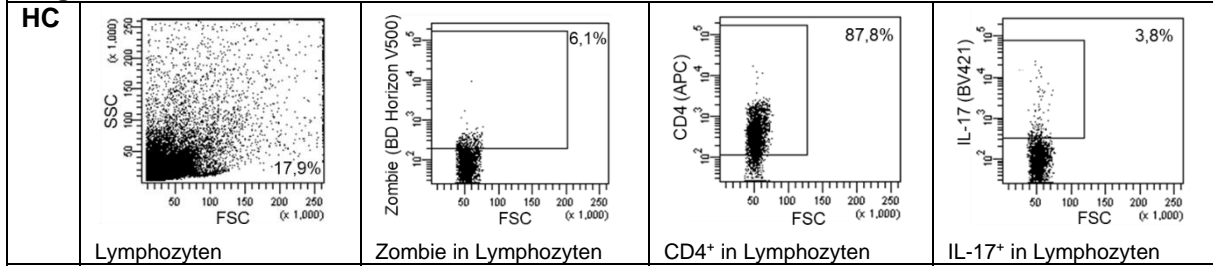
<b>Unstimuliert</b>				
<b>Allgemein</b>				
<b>HC</b>	 Lymphozyten	 Zombie in Lymphozyten	 CD4+ in Lymphozyten	 IL-17+ in Lymphozyten
<b>JIA</b>	 Lymphozyten	 Zombie in Lymphozyten	 CD4+ in Lymphozyten	 IL-17+ in Lymphozyten
<b>HC</b>	 CD25 und CD127 in CD4+			
<b>JIA</b>	 CD25 und CD127 in CD4+			
<b>FoxP3+ in CD4+ Zellen</b>				
<b>HC</b>	 FoxP3+ in CD4+	 IL-17+ in FoxP3+CD4+	 IFNγ+ in FoxP3+CD4+	 IL-17 und IFNγ in FoxP3+CD4+
<b>JIA</b>	 FoxP3+ in CD4+	 IL-17+ in FoxP3+CD4+	 IFNγ+ in FoxP3+CD4+	 IL-17 und IFNγ in FoxP3+CD4+

<b>CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> in FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen</b>				
<b>HC</b>	 <p>CD25 und CD127 in FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup></p>	 <p>IL-17<sup>+</sup> in CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	 <p>IFNγ<sup>+</sup> in CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	 <p>IL-17 und IFNγ in CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>
<b>JIA</b>	 <p>CD25 und CD127 in FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup></p>	 <p>IL-17<sup>+</sup> in CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	 <p>IFNγ<sup>+</sup> in CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	 <p>IL-17 und IFNγ in CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>
<b>CCR6<sup>+</sup> in FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen</b>				
<b>HC</b>	 <p>CCR6<sup>+</sup> in FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	 <p>IL-17<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	 <p>IFNγ<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	 <p>IL-17 und IFNγ in CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>
<b>JIA</b>	 <p>CCR6<sup>+</sup> in FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	 <p>IL-17<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	 <p>IFNγ<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	 <p>IL-17 und IFNγ in CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>
<b>CCR6<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> Zellen</b>				
<b>HC</b>	 <p>CCR6<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup></p>	 <p>IL-17<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	 <p>IFNγ<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	 <p>IL-17 und IFNγ in CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>

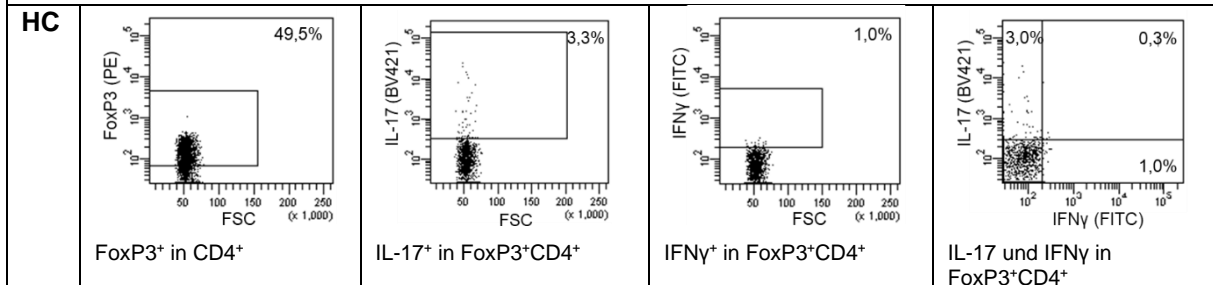


**Anti-CD3, anti-CD28-Stimulation**

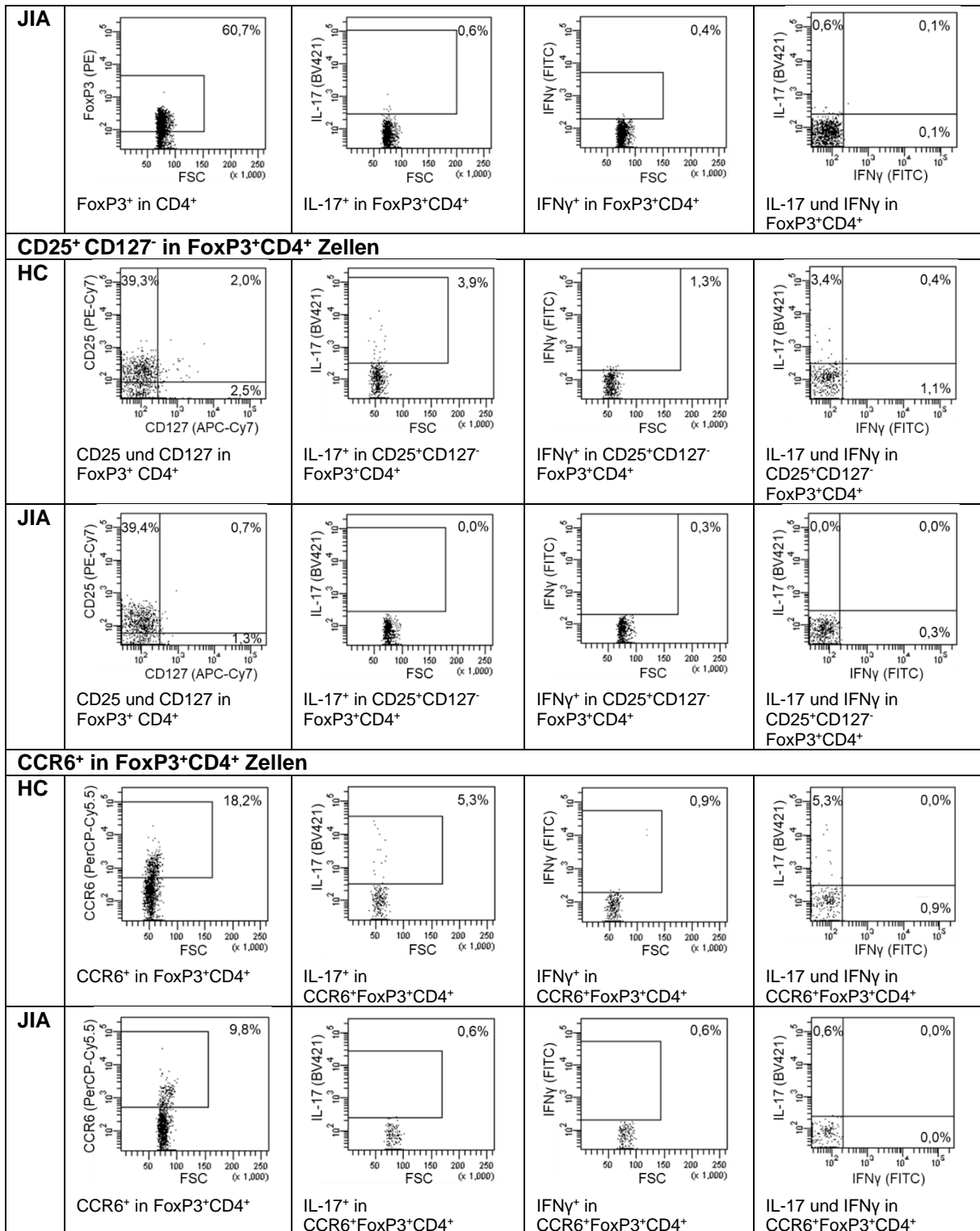
**Allgemein**



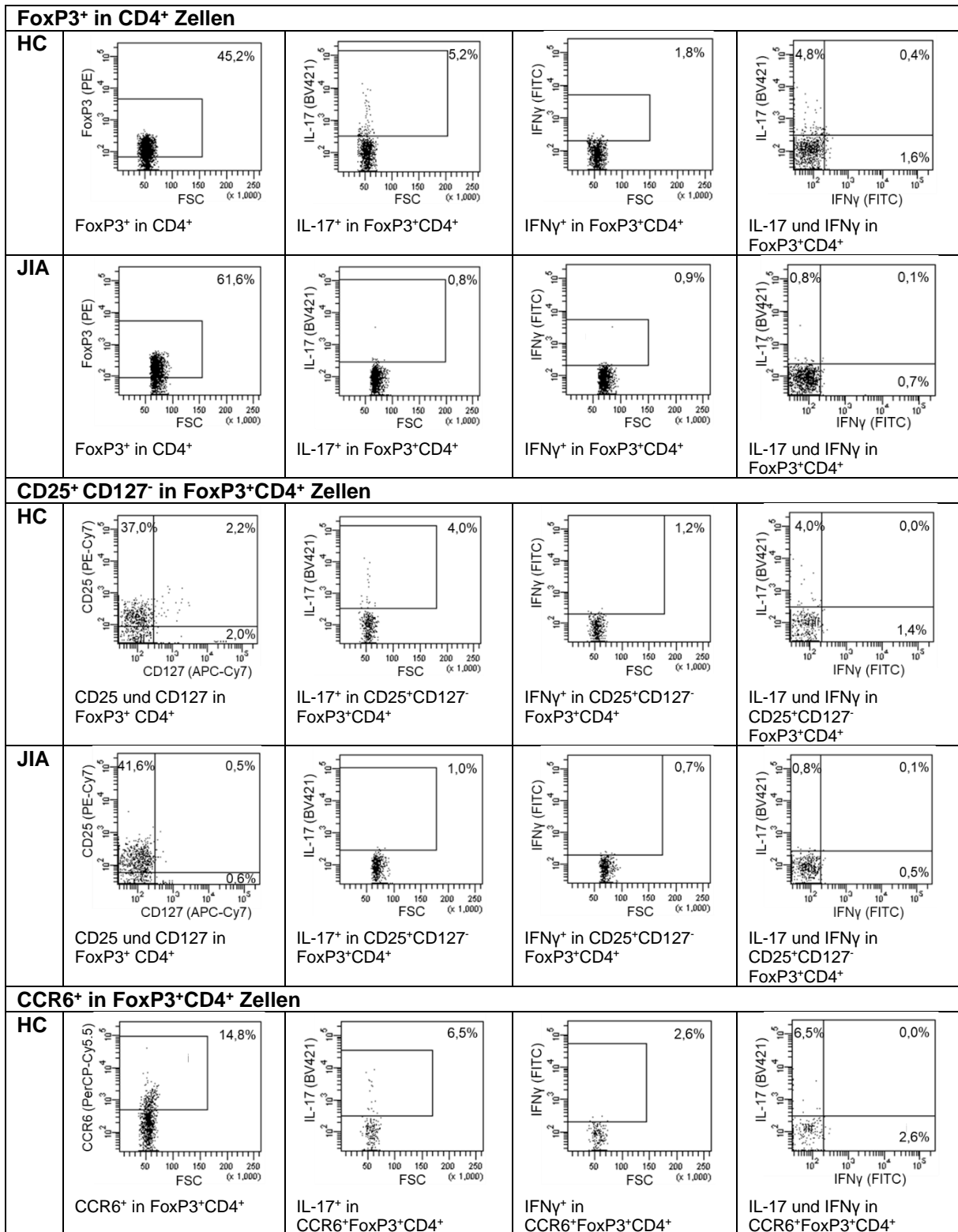
**FoxP3<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> Zellen**

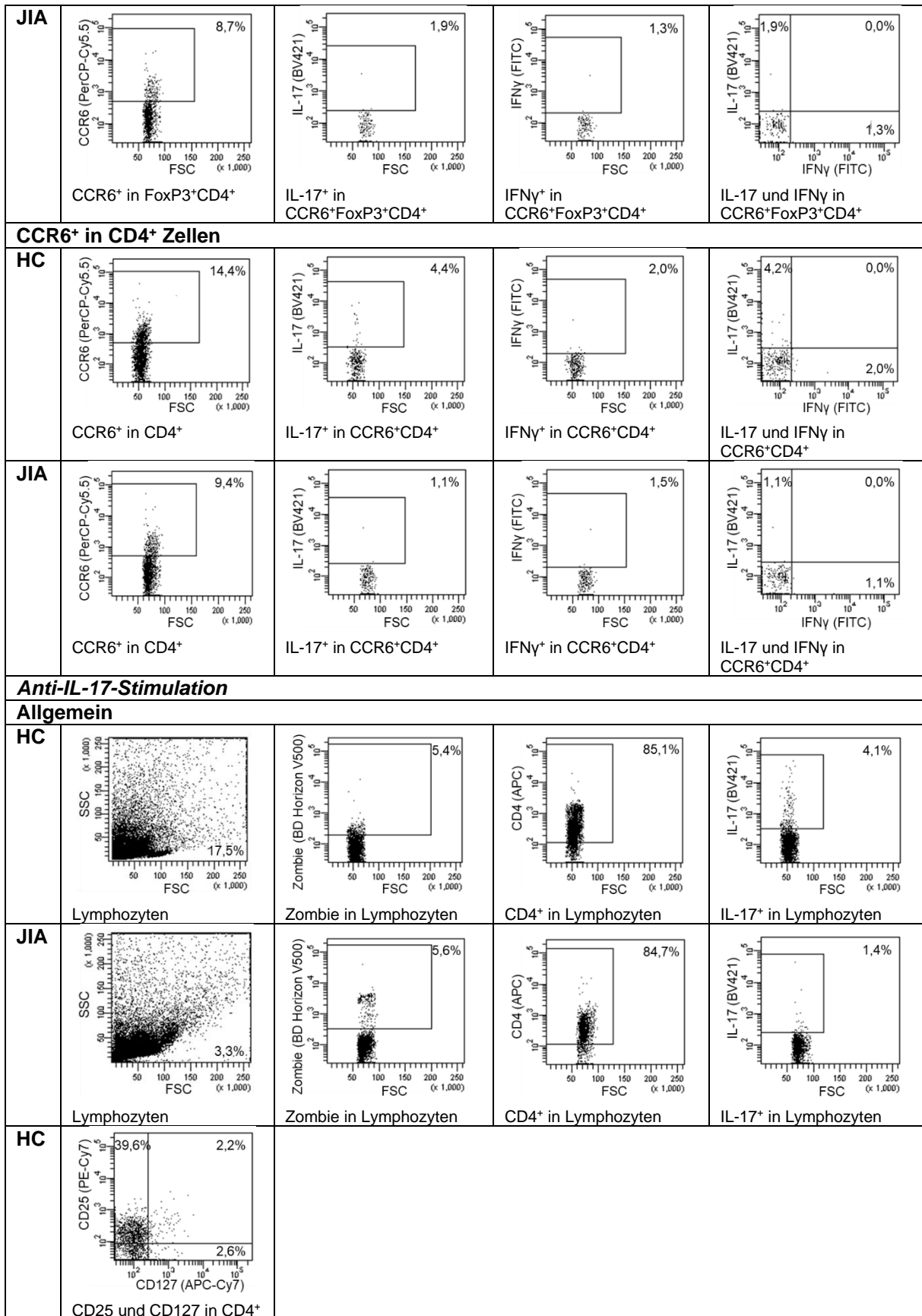


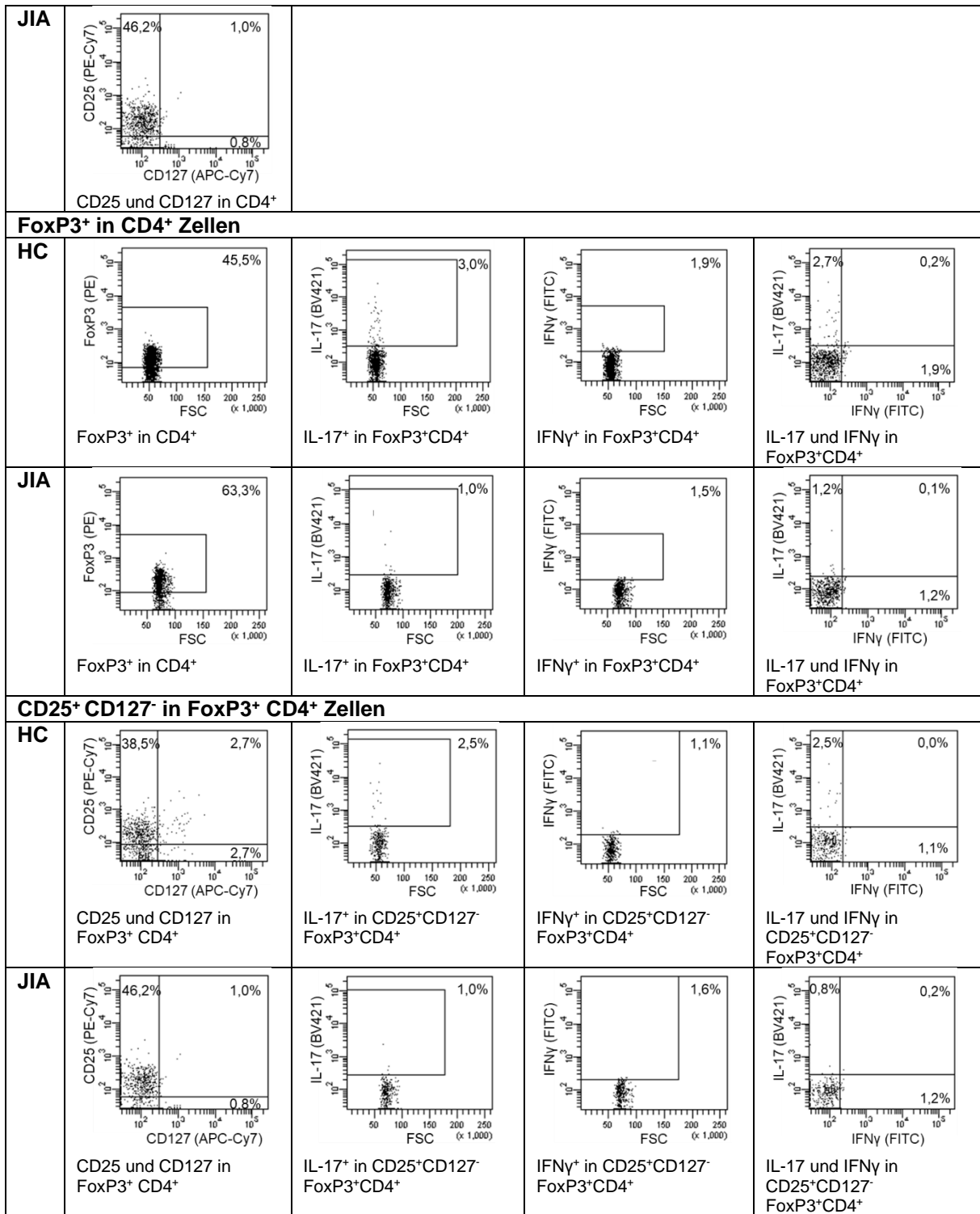


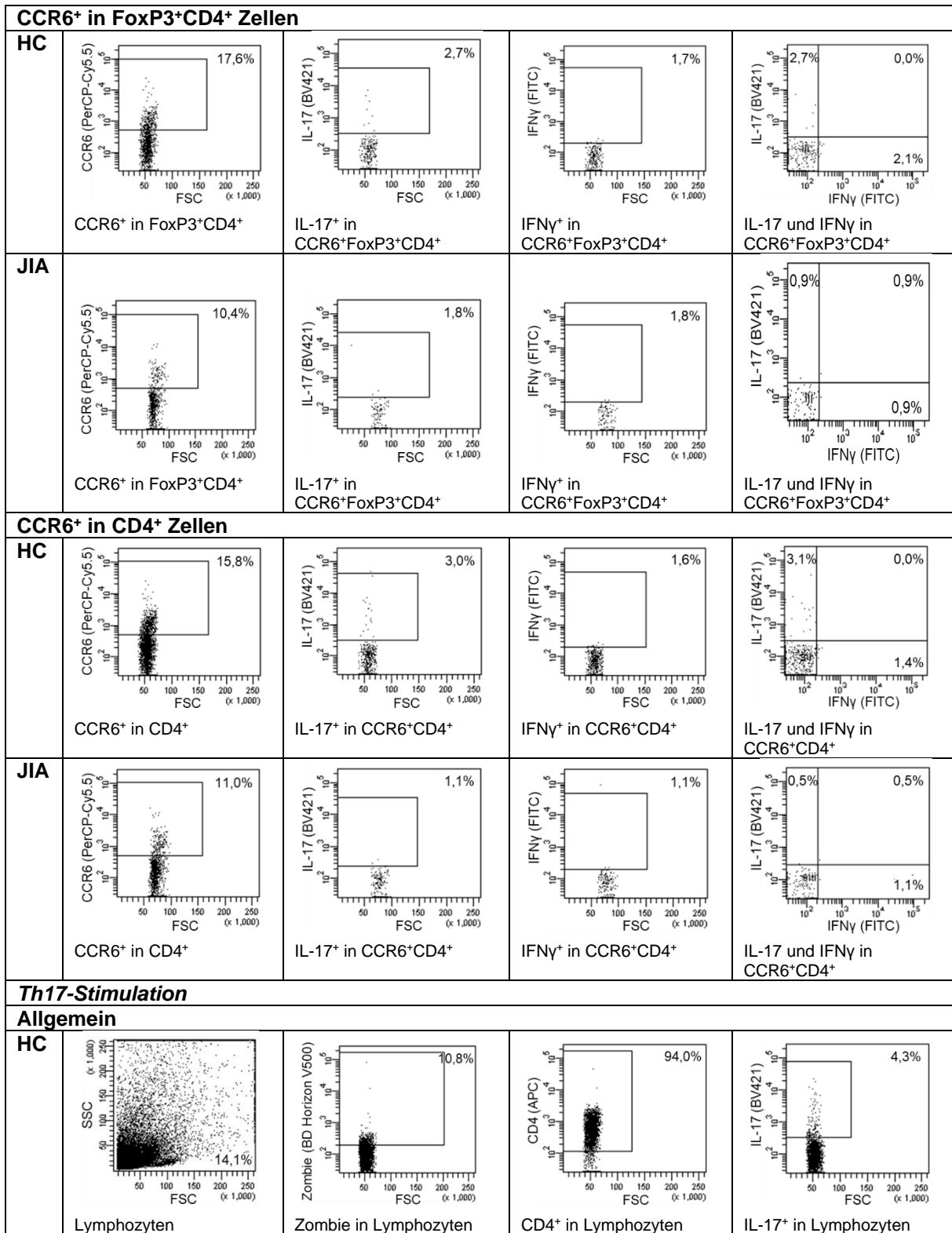


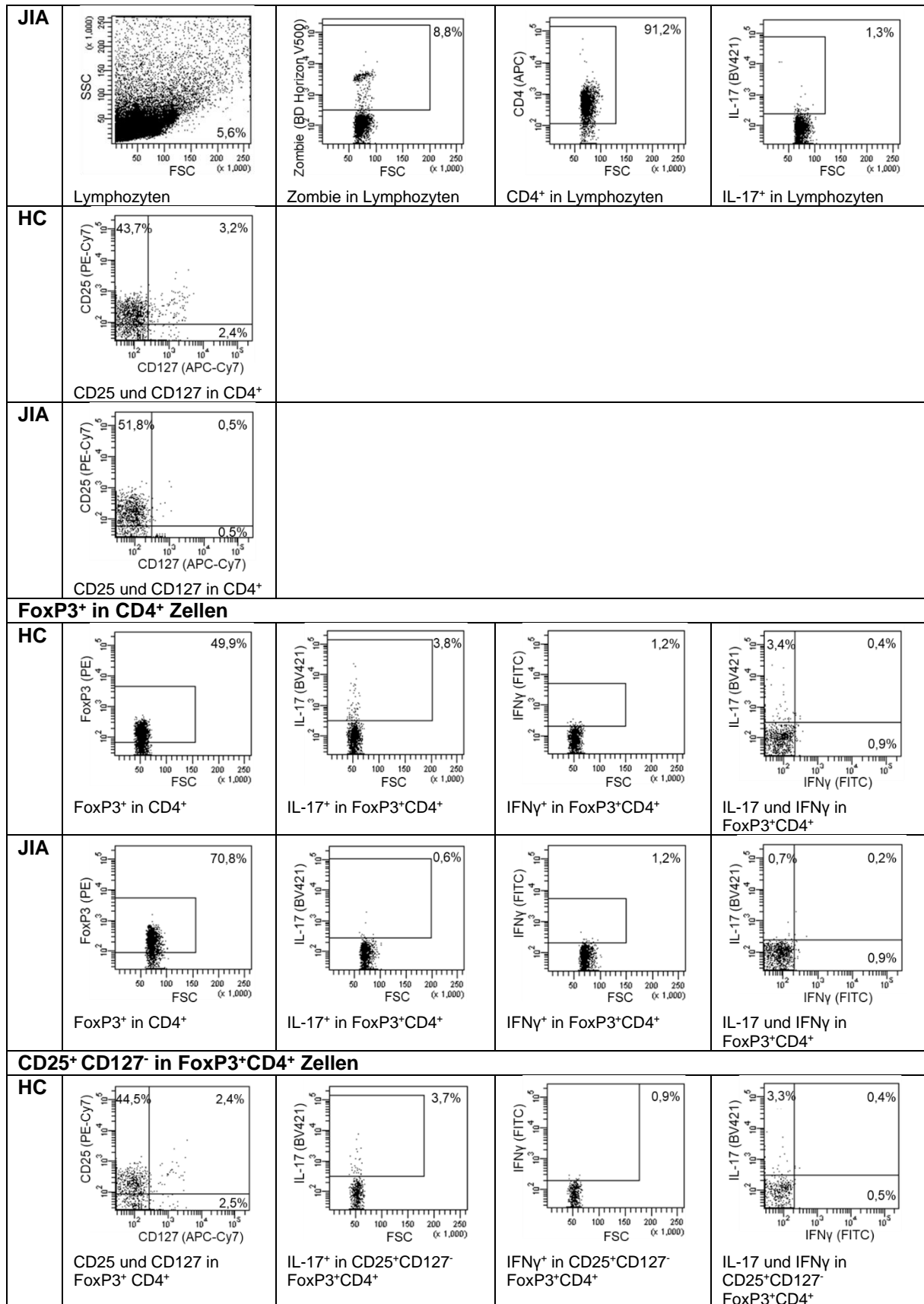
<b>CCR6<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> Zellen</b>				
<b>HC</b>	<p>CCR6<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup></p>	<p>IL-17<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	<p>IFNγ<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	<p>IL-17 und IFNγ in CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>
<b>JIA</b>	<p>CCR6<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup></p>	<p>IL-17<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	<p>IFNγ<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	<p>IL-17 und IFNγ in CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>
<b>IL-17-Stimulation</b>				
<b>Allgemein</b>				
<b>HC</b>	<p>Lymphozyten</p>	<p>Zombie in Lymphozyten</p>	<p>CD4<sup>+</sup> in Lymphozyten</p>	<p>IL-17<sup>+</sup> in Lymphozyten</p>
<b>JIA</b>	<p>Lymphozyten</p>	<p>Zombie in Lymphozyten</p>	<p>CD4<sup>+</sup> in Lymphozyten</p>	<p>IL-17<sup>+</sup> in Lymphozyten</p>
<b>HC</b>	<p>CD25 und CD127 in CD4<sup>+</sup></p>			
<b>JIA</b>	<p>CD25 und CD127 in CD4<sup>+</sup></p>			

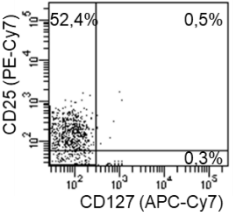
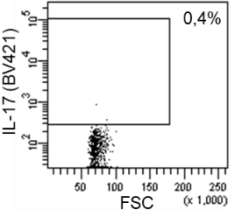
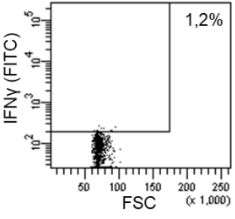
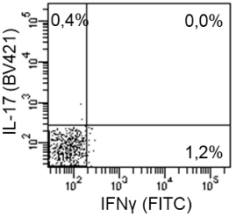
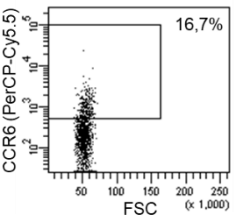
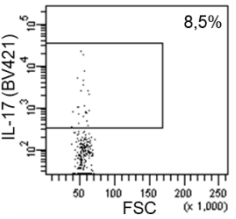
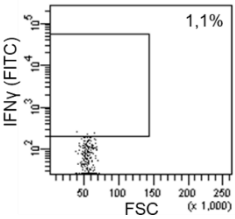
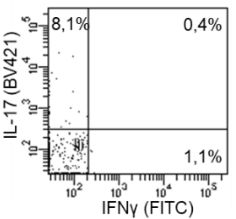
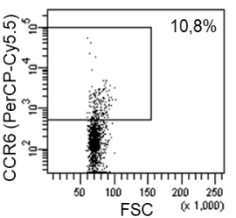
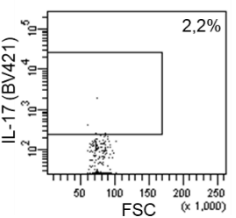
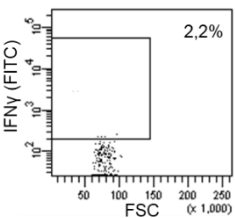
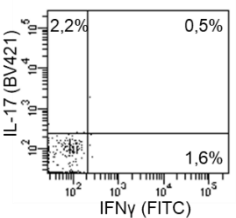
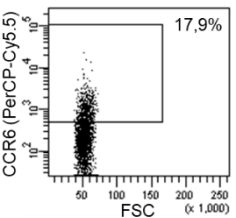
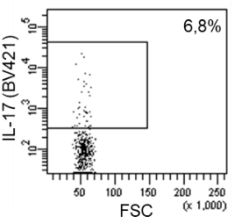
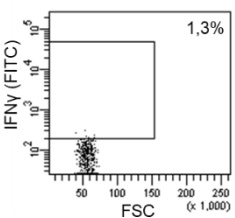
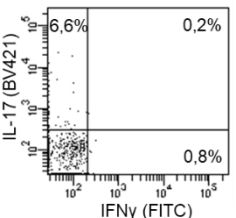
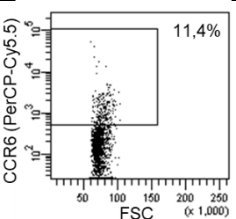
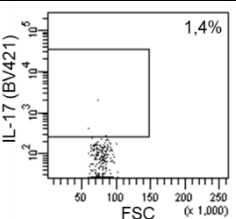
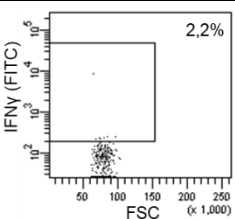
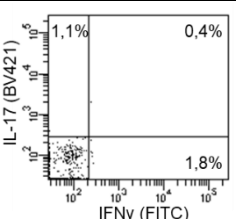




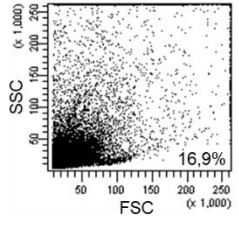
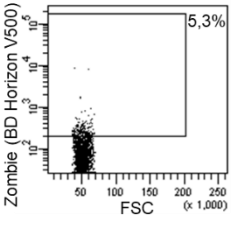
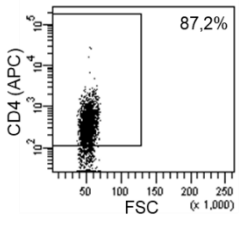
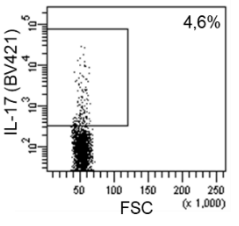
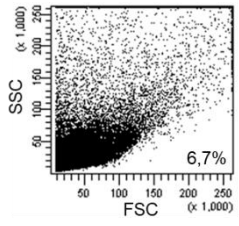
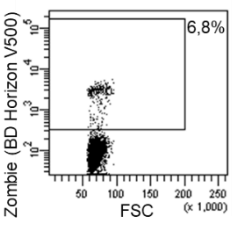
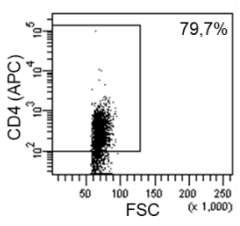
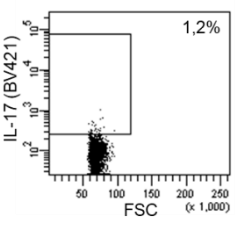
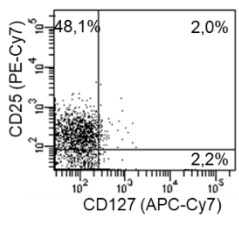
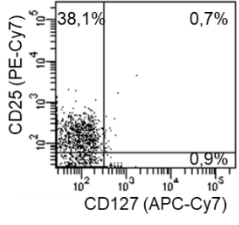
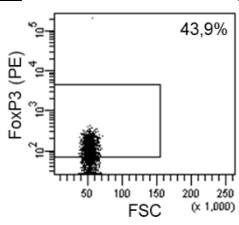
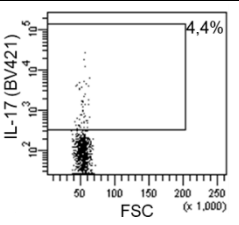
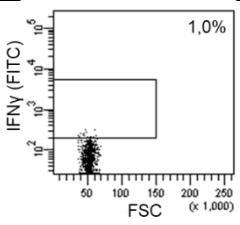
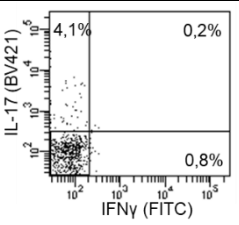
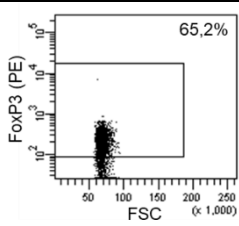
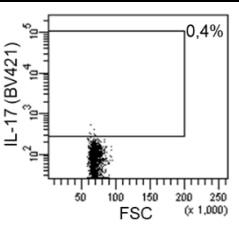
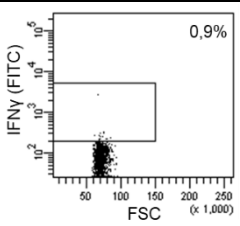
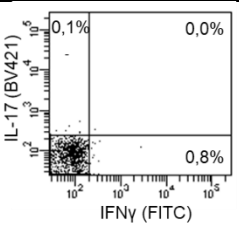




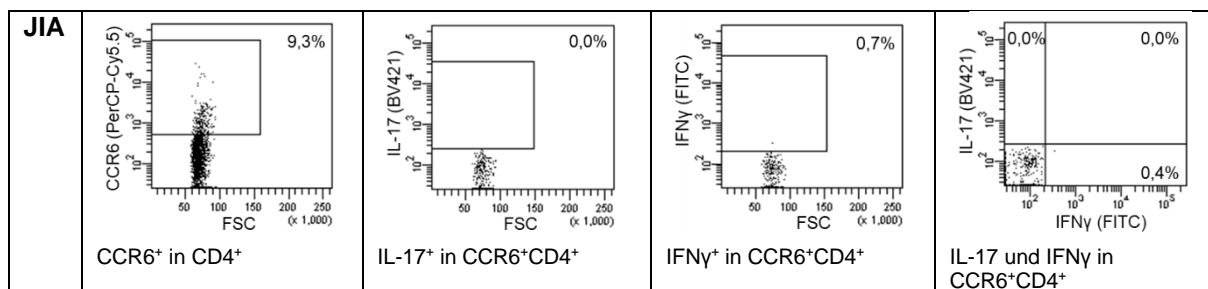


<b>JIA</b>	 <p>CD25 und CD127 in FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup></p>	 <p>IL-17<sup>+</sup> in CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	 <p>IFNγ<sup>+</sup> in CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	 <p>IL-17 und IFNγ in CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>
<b>CCR6<sup>+</sup> in FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen</b>				
<b>HC</b>	 <p>CCR6<sup>+</sup> in FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	 <p>IL-17<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	 <p>IFNγ<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	 <p>IL-17 und IFNγ in CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>
<b>JIA</b>	 <p>CCR6<sup>+</sup> in FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	 <p>IL-17<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	 <p>IFNγ<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	 <p>IL-17 und IFNγ in CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>
<b>CCR6<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> Zellen</b>				
<b>HC</b>	 <p>CCR6<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup></p>	 <p>IL-17<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	 <p>IFNγ<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	 <p>IL-17 und IFNγ in CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>
<b>JIA</b>	 <p>CCR6<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup></p>	 <p>IL-17<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	 <p>IFNγ<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	 <p>IL-17 und IFNγ in CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>



<b>Medikament-Stimulation</b>				
<b>Allgemein</b>				
<b>HC</b>	 Lymphozyten	 Zombie in Lymphozyten	 CD4 <sup>+</sup> in Lymphozyten	 IL-17 <sup>+</sup> in Lymphozyten
<b>JIA</b>	 Lymphozyten	 Zombie in Lymphozyten	 CD4 <sup>+</sup> in Lymphozyten	 IL-17 <sup>+</sup> in Lymphozyten
<b>HC</b>	 CD25 und CD127 in CD4 <sup>+</sup>			
<b>JIA</b>	 CD25 und CD127 in CD4 <sup>+</sup>			
<b>FoxP3<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> Zellen</b>				
<b>HC</b>	 FoxP3 <sup>+</sup> in CD4 <sup>+</sup>	 IL-17 <sup>+</sup> in FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	 IFNγ <sup>+</sup> in FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	 IL-17 und IFNγ in FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>
<b>JIA</b>	 FoxP3 <sup>+</sup> in CD4 <sup>+</sup>	 IL-17 <sup>+</sup> in FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	 IFNγ <sup>+</sup> in FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	 IL-17 und IFNγ in FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>

<b>CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> in FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen</b>				
<b>HC</b>	<p>CD25 und CD127 in FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup></p>	<p>IL-17<sup>+</sup> in CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	<p>IFNγ<sup>+</sup> in CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	<p>IL-17 und IFNγ in CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>
<b>JIA</b>	<p>CD25 und CD127 in FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup></p>	<p>IL-17<sup>+</sup> in CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	<p>IFNγ<sup>+</sup> in CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	<p>IL-17 und IFNγ in CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>
<b>CCR6<sup>+</sup> in FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen</b>				
<b>HC</b>	<p>CCR6<sup>+</sup> in FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	<p>IL-17<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	<p>IFNγ<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	<p>IL-17 und IFNγ in CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>
<b>JIA</b>	<p>CCR6<sup>+</sup> in FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	<p>IL-17<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	<p>IFNγ<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	<p>IL-17 und IFNγ in CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>
<b>CCR6<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> Zellen</b>				
<b>HC</b>	<p>CCR6<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup></p>	<p>IL-17<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	<p>IFNγ<sup>+</sup> in CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>	<p>IL-17 und IFNγ in CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></p>



Prozentangaben der Anteile an den jeweiligen Subpopulationen  
 Nach dem Zombie-Gating (= Ausschluss der toten Zellen) wurden alle Gates in der lebendigen Lymphozytenpopulation (entspricht Nicht-Zombie) gesetzt.

#### 4.4.1 Charakterisierung der Probandengruppen für die Treg-Charakterisierung

Für die Treg-Charakterisierung wurden 6 Patienten und 6 Kontrollen mit möglichst viel vorhandenem (eingefrorenen) Probenmaterial zur Sicherstellung einer für die Kulturversuche ausreichenden Zellzahl verwendet. Die beiden Kohorten werden im Folgenden näher charakterisiert, wobei in Tabelle 42 zunächst die demographischen Merkmale verglichen werden.

**Tabelle 42: Demographische Beschreibung der Patienten- (JIA)- und Kontrollkohorte (HC) der Treg-Charakterisierung**

	JIA		HC		P-Wert
	N	Häufigkeit in %	N	Häufigkeit in %	
Männlich	2	33,3	2	33,3	
Weiblich	4	66,7	4	66,7	
	M ± SD	Median (Min.-Max.)	M ± SD	Median (Min.-Max.)	
Alter in Jahren bei Blutentnahme	17,7 ± 6,9	19,5 (9-27)	23,5 ± 2,4	24,5 (19-25)	0,132
Alter in Jahren bei Diagnose	3,7 ± 0,8	3,5 (3-5)	-	-	-
Krankheitsdauer in Jahren	14 ± 6,9	16,0 (6-24)	-	-	-

M = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min. = Minimalwert; Max. = Maximalwert

##### 4.4.1.1 Charakterisierung der Patientenkohorte

Von den 6 JIA-Patienten waren laut ILAR-Kriterien 4 von einer extended Oligoarthritis, 1 von einer persistierenden Oligoarthritis und 1 von einer RF-negativen Polyarthritis betroffen.

1 Patient erhielt zum Blutentnahme-Zeitpunkt keinerlei Therapie, alle anderen hatten in ihrem Therapieschema zusätzlich zur individuellen konventionellen Basistherapie je ein Biologikum enthalten. Alle Patienten waren sowohl RF, als auch HLA-B27 negativ. 1 Patient war ANA positiv (>1:80).

Labormedizinisch gesehen waren alle Patienten bzgl. des CRPs im Referenzbereich. Je 1 Patient hatte eine erniedrigte und eine erhöhte Leukozytenzahl, 1 Patient eine leicht erhöhte BSG (32 mm/h). Die absolute und relative Lymphozytenzahl war bei 2 Patienten erhöht, 2 Patienten hatten eine leicht erniedrigte Thrombozytenzahl (vgl. Tabelle 43).

**Tabelle 43: Laborwerte der Patientenkohorte der Treg-Charakterisierung**

Laborwert	Referenzbereich	M ± SD	Median (Min.-Max.)
CRP (mg/dl)	<0,5	0,10 ± 0,16	0,02 (0,00-0,39)
BSG (mm/h)	<15-20mm/h	11,8 ± 11,2	9,0 (2-32)
Leukozyten/µl	4800-10000	6650,0 ± 2837,4	3650,0 (2400-10900)
Lymphozyten absolut (G/l)	1,2-3,4	2,8 ± 1,1	2,60 (1,3-4,3)
Lymphozyten relativ (%)	26-46	45,4 ± 10,0	42,1 (37,4-64,0)
Thrombozyten/µl	150000-450000	197500,0 ± 47132,8	215000,0 (138000-242000)

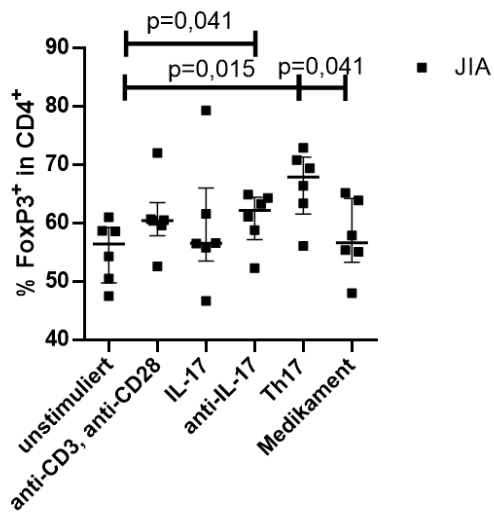
M = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min. = Minimalwert; Max. = Maximalwert

#### **4.4.2 Einfluss der Stimuli auf Phänotyp und funktionale Eigenschaften der Tregs in der JIA-Gruppe**

In diesem Unterkapitel werden die einzelnen Auswirkungen der Stimuli auf die Tregs in der Patientenkohorte (n=6) dargestellt.

##### **4.4.2.1 FoxP3<sup>+</sup>-Zellen in der CD4<sup>+</sup>-Population**

In der FoxP3-Messung stellte sich ein signifikanter Unterschied zwischen je unstimuliertem Ansatz und anti-IL-17 (p = 0,041) bzw. Th17-Milieu (p = 0,015), sowie zwischen Th17-Ansatz und Medikament (p = 0,041) dar. Ebenso ließ sich ein nicht signifikant erhöhter FoxP3<sup>+</sup>-Anteil im Th17-Ansatz verglichen mit dem anti-IL-17-Ansatz abbilden (p = 0,093) (vgl. Tabelle 50, Abbildung 22).



**Abbildung 22: Anteil der FoxP3<sup>+</sup>-Zellen an der CD4<sup>+</sup>-Population in der Patientenkohorte**

Darstellung in % mit Median und Interquartilrange. Oberhalb der eckigen Klammern sind die signifikanten P-Werte ( $p < 0,05$ ) abgebildet. JIA = juvenile idiopathische Arthritis. Die Abbildung verdeutlicht die zur Negativkontrolle signifikant erhöhte FoxP3<sup>+</sup>-Population in den anti-IL-17- und den Th17-Ansätzen, sowie die im Vergleich zum Th17-Ansatz signifikant erniedrigte FoxP3<sup>+</sup>-Population im Medikamentenansatz. Nach Bonferroni-Korrektur (Signifikanzniveau 0,005) verbleibt kein Wert signifikant.

#### 4.4.2.2 *CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>-Zellen in der FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Population und CD4<sup>+</sup>-Population*

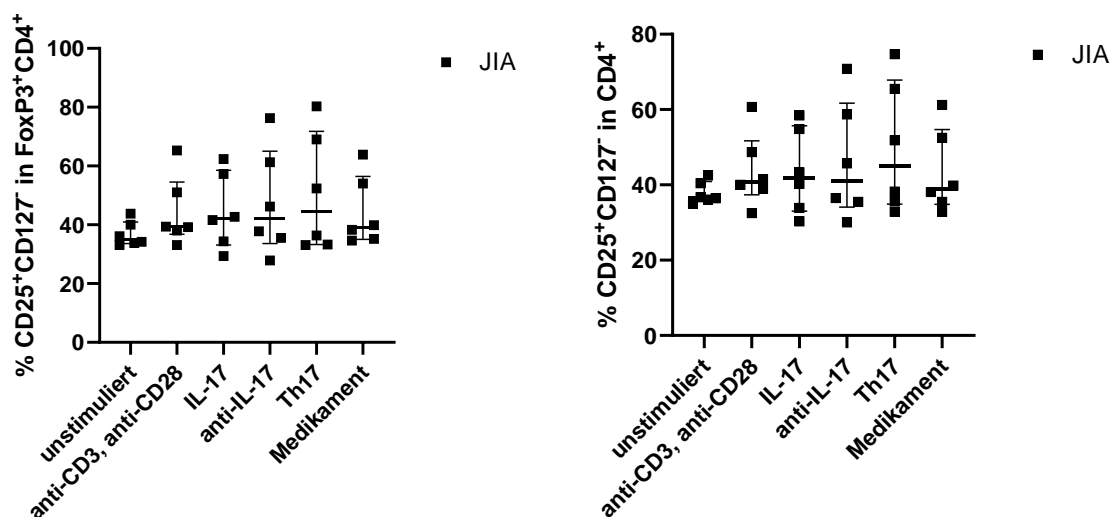
Der Anteil der CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>-Zellen an der FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Population, welche den FoxP3<sup>+</sup>-Tregs entsprechen, unterschied sich innerhalb der verschiedenen Stimuli nicht signifikant. Es ließ sich hier lediglich ein erhöhter Mittelwert im Th17-Milieu feststellen. Ähnliche Verhältnisse ergaben sich beim Anteil der CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>-Zellen an der CD4<sup>+</sup>-Population (vgl. Tabelle 44).

**Tabelle 44: Deskriptive Statistik der CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>-Zellen in der FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-Population in % in der Patientenkohorte**

Stimulus	CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> in FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> in CD4 <sup>+</sup>
unstimuliert	36,83 ± 4,22 (35,15; 33,1-43,8)	37,85 ± 2,92 (36,55; 35,0-42,5)
antiCD3, antiCD28	44,33 ± 11,84 (39,30; 33,1-65,3)	43,73 ± 9,80 (40,75; 32,5-60,7)
IL-17	44,63 ± 12,85 (42,15; 29,4-62,4)	43,50 ± 11,19 (41,80; 30,3-58,4)
Anti-IL-17	47,50 ± 18,13 (42,00; 27,9-76,3)	46,20 ± 15,70 (41,10; 30,0-70,8)
Th17	50,75 ± 20,15 (44,40; 33,1-80,3)	49,78 ± 17,28 (45,00; 32,9-74,7)
Medikament	44,32 ± 11,92 (39,10; 34,6-63,9)	43,33 ± 11,08 (38,95; 32,9-61,2)

Angaben in Mittelwert ± Standardabweichung (Median; Minimum-Maximum)

Vergleichend lassen sich diese Tendenzen in der Abbildung 23 darstellen.



**Abbildung 23: Anteil der CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>-Zellen an der FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- (links) bzw. CD4<sup>+</sup>-Population (rechts) in der Patientenkohorte**

Darstellung in % mit Median und Interquartilrange. JIA = juvenile idiopathische Arthritis  
Die Streudiagramme lassen deutlich werden, dass zum einen der Median des Anteils der CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>-Zellen im Th17-Milieu erhöht ist, zum anderen dort aber auch eine breitere Streuung vorliegt.

#### 4.4.2.3 CCR6<sup>+</sup>-Zellen in der FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Population und CD4<sup>+</sup>-Population

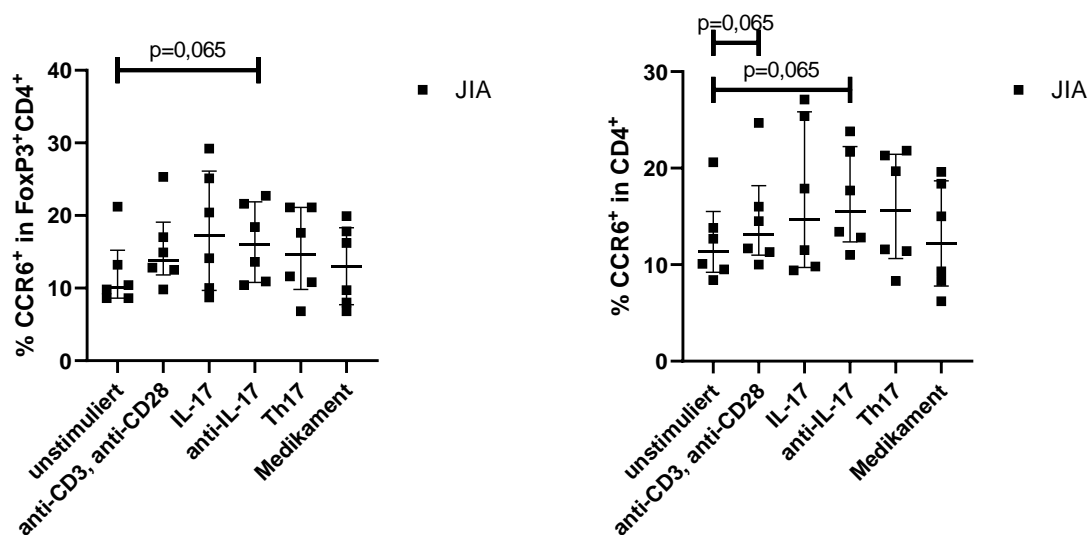
Der Anteil der CCR6<sup>+</sup>-Zellen an der FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Population war in der Patientenkohorte im Vergleich zu der Negativkontrolle im anti-IL-17-Kulturmilieu tendenziell erhöht ( $p = 0,065$ ). Auch die übrigen Stimulantien führten im Schnitt zu einer Vergrößerung dieser Population, jedoch war hier die Streubreite der

Messwerte so groß, dass man keinen relevanten Unterschied zum unstimulierten Ansatz postulieren kann. Der Anteil der CCR6<sup>+</sup>-Zellen der JIA-Gruppe war in der CD4<sup>+</sup>-Population ebenfalls im anti-IL-Ansatz höher als im unstimulierten Ansatz. Zusätzlich war ihr Anteil auch in der Positivkontrolle erhöht (vgl. Tabelle 45, Abbildung 24).

**Tabelle 45: Deskriptive Statistik der CCR6<sup>+</sup>-Zellen in der FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-Population in % in der Patientenkohorte**

Stimulus	CCR6 <sup>+</sup> in FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	CCR6 <sup>+</sup> in CD4 <sup>+</sup>
unstimuliert	11,97 ± 4,83 (10,10; 8,6-21,2)	12,52 ± 4,45 (11,40; 8,4-20,6)
antiCD3, antiCD28	15,38 ± 5,43 (13,85; 9,8-25,3)	14,70 ± 5,37 (13,10; 10,0-24,7)
IL-17	17,92 ± 8,33 (17,25; 8,7-29,2)	16,85 ± 7,91 (14,70; 9,4-27,1)
Anti-IL-17	16,27 ± 5,38 (16,00; 10,4-22,7)	16,73 ± 5,20 (15,55; 11,0-23,8)
Th17	14,83 ± 5,96 (14,60; 6,8-21,1)	15,68 ± 5,91 (15,65; 8,3-21,8)
Medikament	13,07 ± 5,57 (12,95; 6,8-19,9)	12,80 ± 5,63 (12,15; 6,2-19,6)

Angaben in Mittelwert ± Standardabweichung (Median; Minimum-Maximum)



**Abbildung 24: Anteil der CCR6<sup>+</sup>-Zellen an der FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- (links) und CD4<sup>+</sup>-Population (rechts) in der Patientenkohorte**

Darstellung in % mit Median und Interquartilrange. JIA = juvenile idiopathische Arthritis  
In der Abbildung lässt sich je eine Tendenz ( $p = 0,065$ ) zu einem vergrößerten CCR6<sup>+</sup>-Populationsanteil im anti-IL-17 Milieu im Vergleich zu den unstimulierten Proben erkennen.

4.4.2.4 *IL-17<sup>+</sup>-Zellen in der CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>-Population, CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>-Population und FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>-Population*

Bei der Betrachtung der IL-17<sup>+</sup>-Zellen in der CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>-Population, in der CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>-Population sowie in der FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>-Population der Patientengruppe konnte keinerlei statistisch signifikante Veränderung durch das Umgebungsmilieu festgestellt werden. Der tendenziell geringste IL-17<sup>+</sup>-Anteils konnte in allen drei Populationen im Th17-Ansatz festgestellt werden (vgl. Tabelle 46, Abbildung 25).

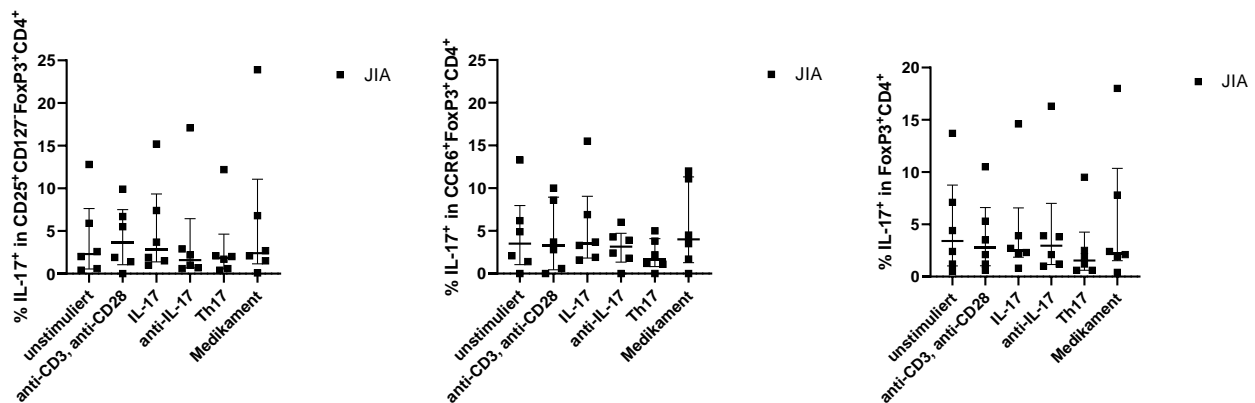
Erwähnenswerterweise finden sich in genau einem Patienten in der CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>- und der FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>-Population deutlich erhöhte IL-17- und IFN $\gamma$ -Werte. Es handelt sich um einen Patienten mit extended Oligoarthritis und 24-jährigem Krankheitsverlauf. Auf diesen Umstand wird außerdem in Kapitel 4.4.4.5 und Kapitel 5.2.1.2 eingegangen.

**Tabelle 46:** Deskriptive Statistik der IL-17<sup>+</sup>-Zellen in den Populationen CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>, CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> und FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> in der Patientenkohorte

Stimulus	IL-17 <sup>+</sup> in CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup>	IL-17 <sup>+</sup> in CCR6 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup>	IL-17 <sup>+</sup> in FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup>
unstimuliert	4,05 ± 4,72 (2,30; 0,4-12,8)	4,65 ± 4,82 (3,50; 0,0-13,3)	4,88 ± 4,94 (3,40; 0,5-13,7)
antiCD3 antiCD28	4,23 ± 3,77 (3,70; 0,0-9,9)	4,28 ± 4,14 (3,25; 0,0-10,0)	3,87 ± 3,66 (2,80; 0,6-10,5)
IL-17	5,12 ± 5,46 (2,80; 1,0-15,2)	5,48 ± 5,26 (3,50; 1,6-15,5)	4,42 ± 5,09 (2,50; 0,8-14,6)
Anti-IL-17	4,08 ± 6,44 (1,60; 0,6-17,1)	3,07 ± 2,11 (3,15; 0,0-6,0)	4,72 ± 5,81 (2,95; 1,0-16,3)
Th17	3,17 ± 4,48 (1,85; 0,4-12,2)	2,22 ± 1,87 (1,70; 0,0-5,0)	2,72 ± 3,41 (1,55; 0,6-9,5)
Medikament	6,18 ± 8,97 (2,40; 0,1-23,9)	5,47 ± 4,97 (4,00; 0,0-12,0)	5,43 ± 6,66 (2,25; 0,4-18,0)

Werte in % anteilig an jeweiliger Lymphozytenpopulation. Angaben in Mittelwert ± Standardabweichung (Median; Minimum-Maximum)





**Abbildung 25:** Anteil der IL-17<sup>+</sup>-Zellen an der CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- (links), CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- (mittig) und FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Population (rechts) in der Patientenkohorte

Darstellung in % mit Median und Interquartilrange. JIA = juvenile idiopathische Arthritis.

#### 4.4.2.5 *IL-17<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>-Zellen in der CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Population, CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Population und FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Population*

Der Anteil der IL-17<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>-Zellpopulation an der CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Fraktion, der CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Fraktion und der FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Fraktion der Patientenkohorte wies keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Kulturmilieus auf (vgl. Tabelle 51).

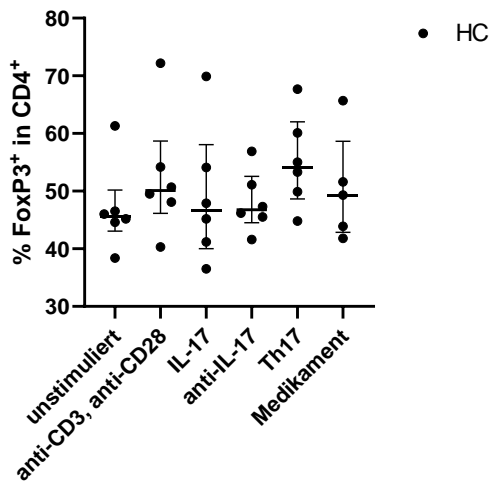
### 4.4.3 Einfluss der Stimuli auf Phänotyp und funktionale Eigenschaften der Tregs in der Kontrollgruppe

Dieses Unterkapitel stellt den Einfluss der Stimuli auf die Tregs der Kontrollkohorte dar. Aufgrund von ungewöhnlich hohen Messwerten von u.a. IL-17 im Medikamentenansatz einer gesunden Kontrolle, welche sich innerhalb dieses Probanden nicht kongruent zu den weiteren Stimuli zeigte, wurde dieser Datensatz aus der Auswertung eliminiert. Daraus folgt n=5 für den Medikamentenansatz und n=6 für alle anderen Stimuli.

#### 4.4.3.1 *FoxP3<sup>+</sup>-Zellen in der CD4<sup>+</sup>-Population*

In der Kontrollgruppe ergaben sich hinsichtlich der FoxP3-Expression in den CD4<sup>+</sup>-Zellen keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den Stimuli. Der

höchste Mittelwert ließ sich ähnlich wie in der Patientenkohorte im Th17-Milieu abbilden (vgl. Tabelle 50, Abbildung 26).



**Abbildung 26:** Anteil der FoxP3<sup>+</sup>-Zellen an der CD4<sup>+</sup>-Population in der Kontrollkohorte  
Darstellung in % mit Median und Interquartilrange. HC = Healthy Control.

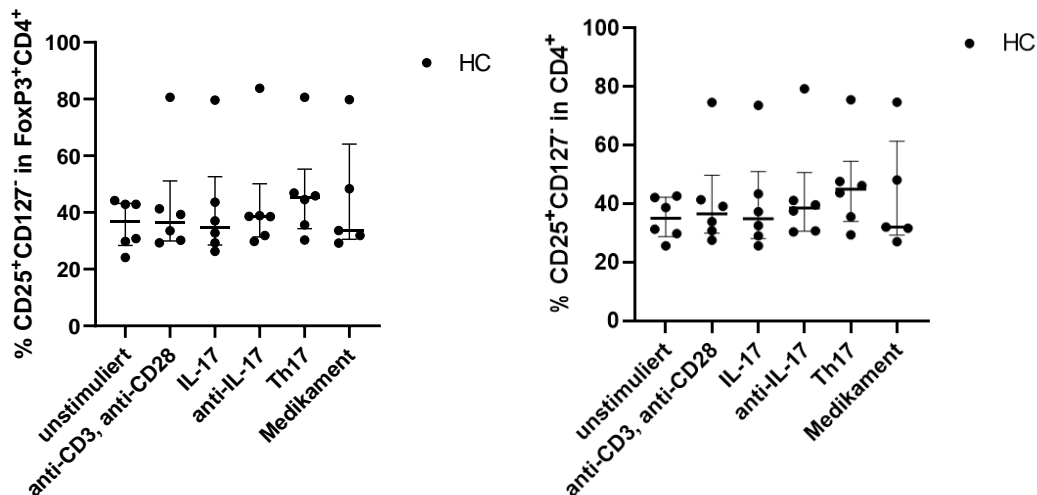
#### 4.4.3.2 CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>-Zellen in der FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Population und CD4<sup>+</sup>-Population

Analog zur Patientengruppe unterschied sich der Anteil der Tregs innerhalb der CD4<sup>+</sup>-Zellen und der FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen nicht signifikant. Auch hier ließ sich wie in der Patientengruppe der höchste Mittelwert im Th17-Milieu feststellen (vgl. Tabelle 47, Abbildung 27).

**Tabelle 47:** Deskriptive Statistik der CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>-Zellen in der FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-Population in % in der Kontrollkohorte

Stimulus	CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> in FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> in CD4 <sup>+</sup>
unstimuliert	35,78 ± 8,59 (36,85; 24,1-44,2)	35,02 ± 7,08 (35,00; 25,6-42,6)
antiCD3 antiCD28	42,37 ± 19,34 (36,40; 29,3-80,6)	41,22 ± 17,14 (36,50; 27,5-74,6)
IL-17	41,43 ± 19,66 (34,90; 26,3-79,6)	40,23 ± 17,05 (34,90; 25,6; 73,6)
Anti-IL-17	43,58 ± 20,08 (38,55; 29,8-83,8)	43,10 ± 18,29 (38,55; 30,4-79,3)
Th17	47,30 ± 17,58 (45,20; 30,3-80,6)	46,32 ± 15,90 (44,95; 29,4-75,5)
Medikament	44,58 ± 21,05 (33,60; 29,2-79,8)	42,68 ± 19,60 (32,00; 27,0-74,7)

Angaben in Mittelwert ± Standardabweichung (Median; Minimum-Maximum)



**Abbildung 27:** Anteil der CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>-Zellen an der FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- (links) bzw. CD4<sup>+</sup>-Population (rechts) in der Kontrollkohorte

Darstellung in % mit Median und Interquartilrange. HC = Healthy Control. Die Streudiagramme lassen deutlich werden, dass der Median des Anteils der CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>-Zellen in beiden Populationen im Th17-Milieu erhöht ist.

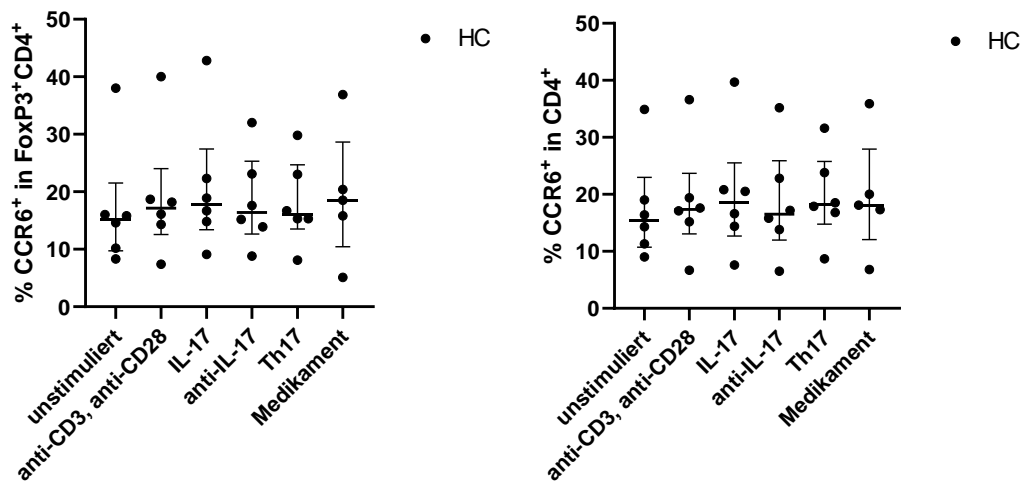
#### 4.4.3.3 CCR6<sup>+</sup>-Zellen in der FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Population und CD4<sup>+</sup>-Population

In der Kontrollgruppe zeigte sich weder in der FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- noch in der CD4<sup>+</sup>-Population ein Unterschied in der CCR6-Expression zwischen den einzelnen Stimuli (vgl. Tabelle 48, Abbildung 28).

**Tabelle 48:** Deskriptive Statistik der CCR6<sup>+</sup>-Zellen in der FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-Population in % in der Kontrollkohorte

Stimulus	CCR6 <sup>+</sup> in FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	CCR6 <sup>+</sup> in CD4 <sup>+</sup>
unstimuliert	17,15 ± 10,69 (15,20; 8,3-38,0)	17,48 ± 9,24 (15,35; 9,0-34,9)
antiCD3, antiCD28	19,12 ± 11,02 (17,15; 7,4-40,0)	18,77 ± 9,81 (17,35; 6,7-36,6)
IL-17	20,77 ± 11,66 (17,80; 9,1-42,8)	19,93 ± 10,82 (18,55; 7,6-39,7)
Anti-IL-17	18,43 ± 8,13 (16,40; 8,8-32,0)	18,55 ± 9,72 (16,50; 6,5-35,2)
Th17	18,03 ± 7,46 (16,00; 8,1-29,8)	19,55 ± 7,65 (18,20; 8,7-31,6)
Medikament	19,34 ± 11,46 (18,50; 5,1-36,9)	19,62 ± 10,46 (18,10; 6,8-35,9)

Angaben in Mittelwert ± Standardabweichung (Median; Minimum-Maximum)



**Abbildung 28:** Anteil der CCR6<sup>+</sup>-Zellen an der FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- (links) und CD4<sup>+</sup>-Population (rechts) in der Kontrollkohorte

Darstellung in % mit Median und Interquartilrange. HC = Healthy Control.

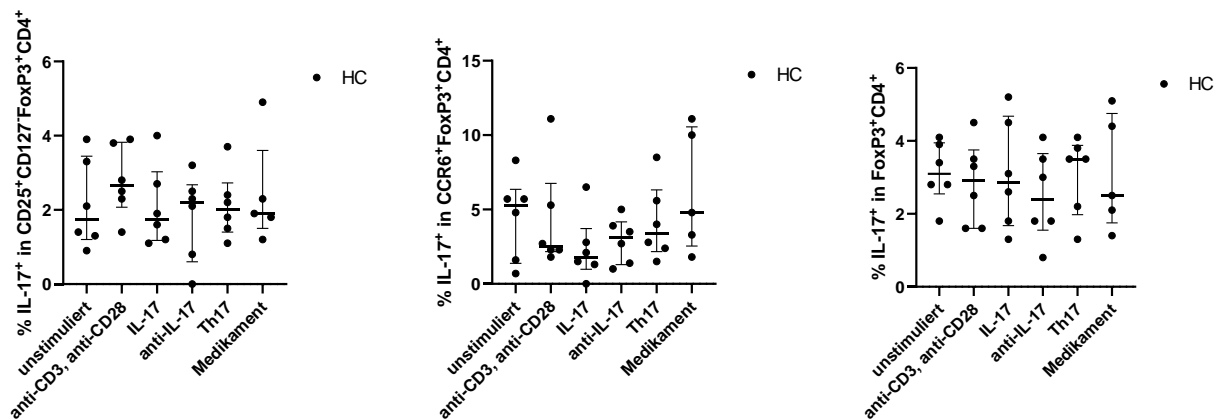
#### 4.4.3.4 *IL-17<sup>+</sup>-Zellen in der CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Population, CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Population und FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Population*

Während sich in der CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- und FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Population keine Signifikanzen bzgl. der IL-17<sup>+</sup>-Zellen feststellen ließ und lediglich eine Tendenz zur niedrigsten IL-17-Messung im anti-IL-17-Milieu zu verzeichnen war, zeigte sich in der Population CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen eine im Vergleich zum Medikament deutlich verringerte IL-17-Produktion im IL-17-Ansatz selbst ( $p = 0,082$ ) (vgl. Abbildung 29). Im Gegensatz zur JIA-Gruppe ließen sich in der Kontrolle in der Th17-Stimulation keine erniedrigten IL-17-Werte feststellen (vgl. Tabelle 49).

**Tabelle 49: Deskriptive Statistik der IL-17<sup>+</sup>-Zellen in den Populationen CD25<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> und FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> in der Kontrollkohorte**

Stimulus	IL-17 <sup>+</sup> in CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	IL-17 <sup>+</sup> in CCR6 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	IL-17 <sup>+</sup> in FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>
unstimuliert	2,15 ± 1,20 (1,75; 0,9-3,9)	4,47 ± 2,84 (5,25; 0,7-8,3)	3,13 ± 0,85 (3,10; 1,8-4,1)
antiCD3 antiCD28	2,78 ± 0,95 (2,65; 1,4-3,9)	4,25 ± 3,58 (2,50; 1,8-11,1)	2,83 ± 1,15 (2,90; 1,6-4,5)
IL-17	2,08 ± 1,10 (1,75; 1,1-4,0)	2,37 ± 2,23 (1,80; 0,0-6,5)	3,08 ± 1,52 (2,85; 1,3-5,2)
Anti-IL-17	1,82 ± 1,19 (2,20; 0,0-3,2)	2,92 ± 1,53 (3,10; 1,0-5,0)	2,50 ± 1,24 (2,40; 0,8-4,1)
Th17	2,12 ± 0,91 (2,00; 1,1-3,7)	4,13 ± 2,57 (3,40; 1,5-8,5)	3,07 ± 1,08 (3,50; 1,3-4,1)
Medikament	2,42 ± 1,44 (1,90; 1,2-4,9)	6,20 ± 4,13 (4,80; 1,8-11,1)	3,10 ± 1,58 (2,50; 1,4-5,1)

Werte in % anteilig an jeweiliger Lymphozytenpopulation. Angaben in Mittelwert ± Standardabweichung (Median; Minimum-Maximum)



**Abbildung 29: Anteil der IL-17<sup>+</sup>-Zellen an der CD25<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- (links), CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- (mittig) und FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Population (rechts) in der Kontrollkohorte**

Darstellung in % mit Median und Interquartilrange. HC = Healthy Control. Ersichtlich wird eine deutliche Verringerung der IL-17-Produktion im IL-17-Ansatz verglichen mit dem Medikamentenansatz in der CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Population ( $p = 0,082$ ).

#### 4.4.3.5 IL-17<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>-Zellen in der CD25<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Population, CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Population und FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Population

In der Kontrollgruppe zeigte sich bezogen auf die IL-17<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>-Zellpopulation in den genannten Populationen keinerlei signifikanter Einfluss durch die unterschiedlichen Stimuli (vgl. Tabelle 51).

#### 4.4.4 Vergleich der Treg-Charakterisierungen der beiden Gruppen

In diesem Unterkapitel werden die Stimulieinflüsse auf Phänotyp und funktionale Eigenschaften der Tregs der Patienten mit denen der Kontrollen verglichen.

##### 4.4.4.1 FoxP3<sup>+</sup>-Zellen in der CD4<sup>+</sup>-Population

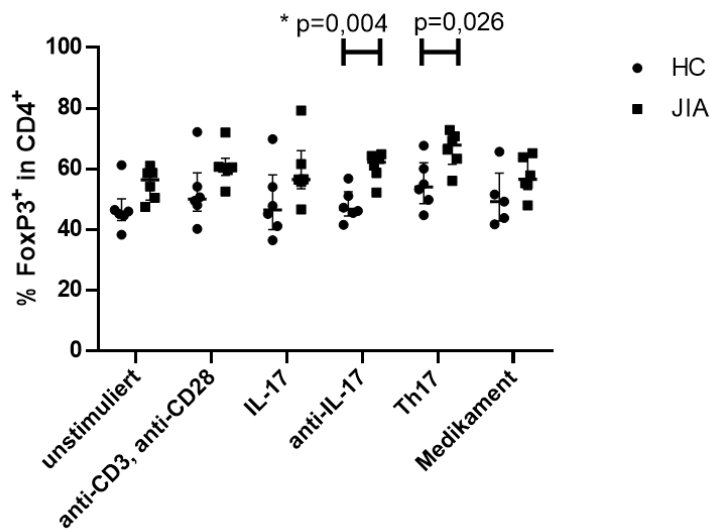
Während die gesunden Kontrollen in allen Stimuli einen niedrigeren Anteil an FoxP3<sup>+</sup>-Zellen an der CD4<sup>+</sup>-Population hatten als die Patienten, erwiesen sich die erhöhten FoxP3<sup>+</sup>-Spiegel in der Patientengruppe im anti-IL-17- und im Th17-Ansatz als signifikant (vgl. Tabelle 50 und Abbildung 30).

**Tabelle 50: Vergleichende Statistik der FoxP3<sup>+</sup>-Zellen in CD4<sup>+</sup>-Zellen bei Kontroll- und Patientenkohorte**

	HC	JIA	P-Wert
unstimuliert	47,00 ± 7,60 (45,60; 38,4-61,3)	55,10 ± 5,28 (56,45; 47,5-61,0)	0,065
antiCD3, antiCD28	52,50 ± 10,69 (50,10; 40,3-72,2)	60,97 ± 6,23 (60,45; 52,6-72,0)	0,093
IL-17	49,13 ± 11,79 (46,55; 36,5-69,9)	59,42 ± 10,88 (56,55; 46,7-79,3)	0,093
Anti-IL-17	48,10 ± 5,29 (46,75; 41,6-56,9)	60,78 ± 4,73 (62,20; 52,3-64,9)	<b>0,004*</b>
Th17	55,13 ± 8,00 (54,15; 44,8-67,7)	66,50 ± 6,09 (67,90; 56,1-72,9)	0,026
Medikament	50,46 ± 9,39 (49,30; 41,8-65,7)	57,58 ± 6,34 (56,65; 48,0-65,2)	0,247

Werte in % anteilig an jeweiliger Lymphozytenpopulation. Angaben in Mittelwert ± Standardabweichung (Median; Minimum-Maximum)

P-Wert-Angabe als Vergleich HC mit JIA (Mann-Whitney-U Test); \* = signifikant nach Bonferroni-Korrektur. HC = Healthy Control, JIA = juvenile idiopathische Arthritis.



**Abbildung 30: Vergleich der FoxP3-Expression in % in CD4<sup>+</sup>-Zellen zwischen Patienten (JIA)- und Kontrollkohorte (HC)**

Die CD4<sup>+</sup>-Zellen der Kontrollgruppe haben eine durchweg geringere FoxP3-Expression im Vergleich zur Patientengruppe. Der Unterschied wird insbesondere im anti-IL-17 und Th17-Milieu signifikant. Nach Bonferroni-Korrektur (Signifikanzniveau 0,01) verbleibt der Unterschied im anti-IL-17-Ansatz (\*) signifikant.

#### 4.4.4.2 *CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>-Zellen in der FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Population und CD4<sup>+</sup>-Population*

Im Vergleich der CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>-Zellen ließen sich weder in der FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- noch in der CD4<sup>+</sup>-Population signifikante Unterschiede zwischen den beiden Kohorten feststellen. In beiden Gruppen wurde im Th17-Ansatz der höchste Mittelwert an CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>-Zellen gefunden, wobei diese Zellpopulation in allen Stimuliansätzen in der Patientengruppe höhere Werte aufwies als in der Kontrollgruppe (vgl. Tabelle 44 bzw. Kapitel 4.4.2.2 und Tabelle 47 bzw. Kapitel 4.4.3.2).

#### 4.4.4.3 *CCR6<sup>+</sup>-Zellen in der FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Population und CD4<sup>+</sup>-Population*

Weder in der FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- noch in der CD4<sup>+</sup>-Population ließen sich signifikante Unterschiede zwischen der HC- und JIA-Gruppe in den jeweiligen Stimuli bezüglich der CCR6-Expression feststellen (vgl. Tabelle 45, Tabelle 48).

#### 4.4.4.4 *IL-17<sup>+</sup>-Zellen in der CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Population, CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Population und FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Population*

Bezüglich des Anteils der IL17<sup>+</sup>-Zellen an den Populationen CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> bzw. FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten- und Kontrollgruppe. Im Vergleich der Mittelwerte zeigte sich der Anteil der IL-17<sup>+</sup>-Zellen in den jeweiligen Subpopulationen tendenziell in der JIA-Gruppe erhöht (vgl. Tabelle 46, Tabelle 49).

#### 4.4.4.5 *IL-17<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>-Zellen in der CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Population, CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Population und FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Population*

Im Vergleich der Patienten- mit der Kontrollgruppe ergab sich für die IL-17<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>-Zellen in den Zellpopulationen CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> und FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> keinerlei signifikanter Unterschied.

Lediglich eine Tendenz zu vermehrt IL-17- und IFN $\gamma$ -doppelt-positiven Zellen in der Patientenkohorte war in der CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Population im anti-CD3/anti-CD28-Ansatz ( $p = 0,093$ ) sowie im unstimulierten Ansatz in der FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Population ( $p = 0,093$ ) zu vermerken (vgl. Tabelle 51, Abbildung 31).

Interessanterweise zeigt sich in den Subpopulationen der CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- und FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Population jeweils derselbe JIA-Patient mit extended Oligoarthritis und 24-jährigem Krankheitsverlauf mit erhöhten IL-17 und IFN $\gamma$ -Werten (vgl. auch Kapitel 4.4.2.4 und Kapitel 5.2.1.2).

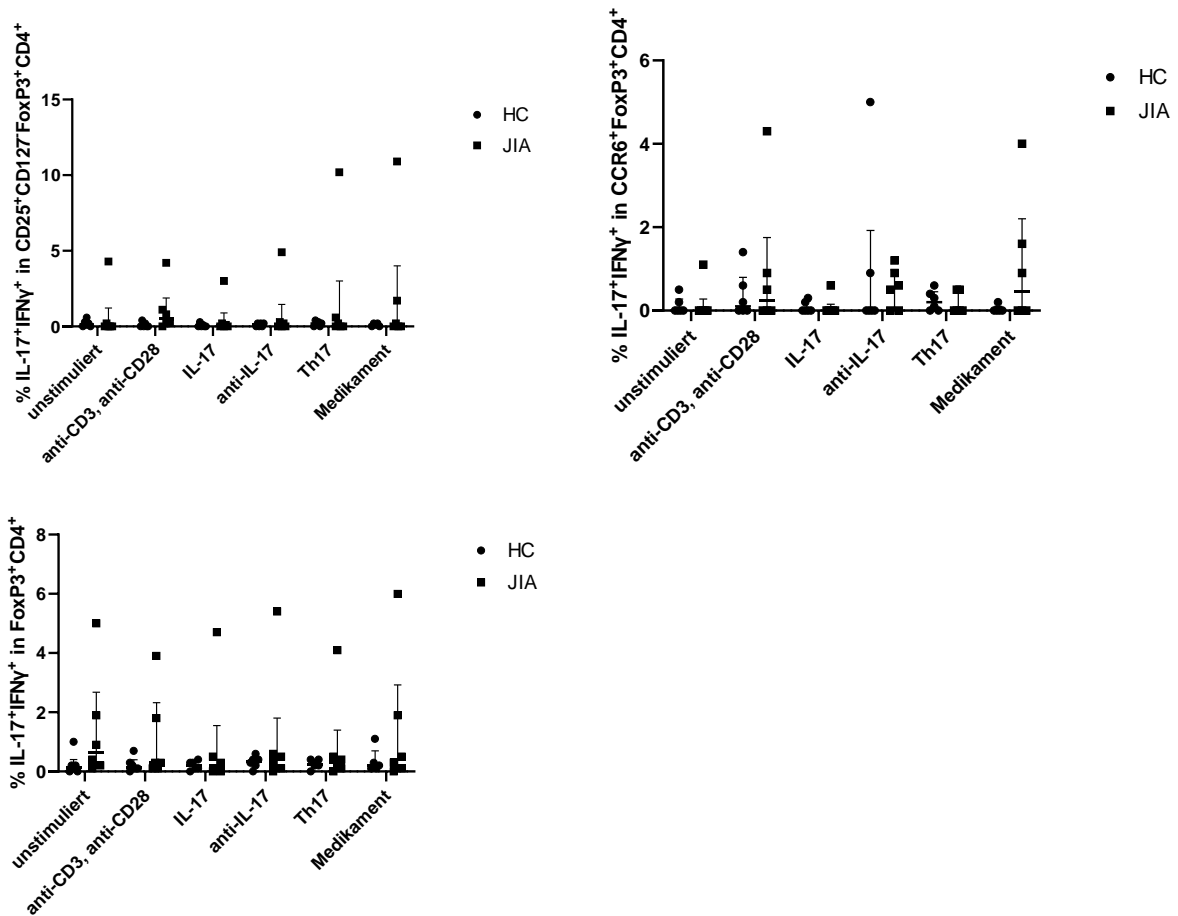


**Tabelle 51: Vergleich des Anteils der IL-17<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>-Zellen in % an den Populationen CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> und FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> zwischen Patienten- und Kontrollgruppe**

Stimulus	IL-17 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> in CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>			IL-17 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> in CCR6 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>			IL-17 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> in FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>		
	HC	JIA	P-Wert	HC	JIA	P-Wert	HC	JIA	P-Wert
unstimuliert	0,20 ± 0,23 (0,15; 0,0-0,6)	0,75 ± 1,74 (0,00; 0,0-4,3)	0,485	0,12 ± 0,20 (0,00; 0,0-0,5)	0,18 ± 0,45 (0,00; 0,0-1,1)	0,818	0,25 ± 0,38 (0,15; 0,0-1,0)	1,4 ± 1,88 (0,65; 0,1-5,0)	0,093
Anti-CD3 anti-CD28	0,10 ± 0,17 (0,00; 0,0-0,4)	1,08 ± 1,58 (0,50; 0,0-4,2)	0,093	0,37 ± 0,56 (0,10; 0,0-1,4)	0,95 ± 1,68 (0,25; 0,0-4,3)	0,818	0,23 ± 0,25 (0,15; 0,0-0,7)	1,08 ± 1,52 (0,30; 0,1-3,9)	0,310
IL-17	0,07 ± 0,12 (0,00; 0,0-0,3)	0,55 ± 1,20 (0,05; 0,0-3,0)	0,589	0,08 ± 0,13 (0,00; 0,0-0,3)	0,10 ± 0,24 (0,00; 0,0-0,6)	0,818	0,20 ± 0,15 (0,20; 0,0-0,4)	0,93 ± 1,86 (0,20; 0,0-4,7)	0,937
Anti-IL-17	0,10 ± 0,11 (0,10; 0,0-0,2)	0,90 ± 1,96 (0,10; 0,0-4,9)	0,699	0,98 ± 2,00 (0,00; 0,0-5,0)	0,53 ± 0,48 (0,55; 0,0-1,2)	0,589	0,32 ± 0,20 (0,35; 0,0-0,6)	1,15 ± 2,09 (0,40; 0,0-5,4)	0,699
Th17	0,18 ± 0,16 (0,20; 0,0-0,4)	1,83 ± 4,11 (0,10; 0,0-10,2)	1,000	0,23 ± 0,24 (0,20; 0,0-0,6)	0,17 ± 0,26 (0,00; 0,0-0,5)	0,589	0,25 ± 0,15 (0,25; 0,0-0,4)	0,88 ± 1,59 (0,30; 0,0-4,1)	0,699
Medikament	0,10 ± 0,10 (0,10; 0,0-0,2)	2,13 ± 4,35 (0,10; 0,0-10,9)	0,792	0,04 ± 0,09 (0,00; 0,0-0,2)	1,08 ± 1,57 (0,45; 0,0-4,0)	0,329	0,36 ± 0,42 (0,20; 0,1-1,1)	1,47 ± 2,33 (0,40; 0,0-6,0)	0,537

Werte in % anteilig an jeweiliger Lymphozytenpopulation. Angaben in Mittelwert ± Standardabweichung (Median; Minimum-Maximum)

P-Wert-Angabe als Vergleich HC mit JIA (Mann-Whitney-U Test). HC = Healthy Control, JIA = juvenile idiopathische Arthritis.



**Abbildung 31:** Anteil der IL-17<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>-Zellen an der CD25<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- (links oben), CCR6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- (rechts oben) und FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Population (links unten) in der Kontroll- und Patientenkohorte

Darstellung in % mit Median und Interquartilrange

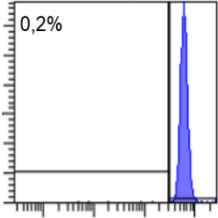
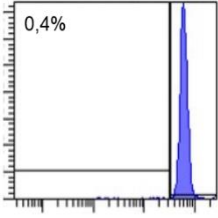
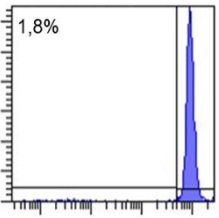
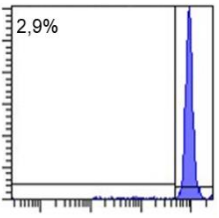
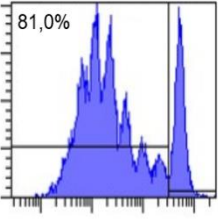
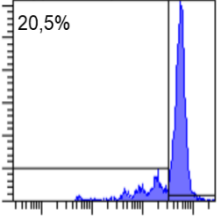
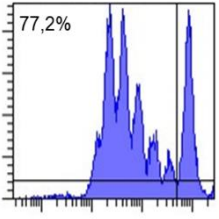
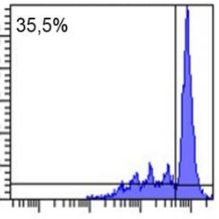
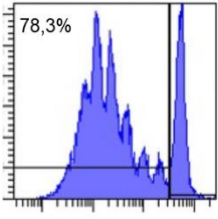
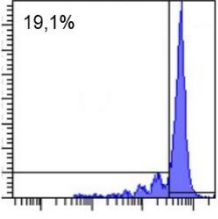
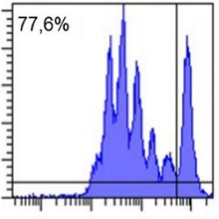
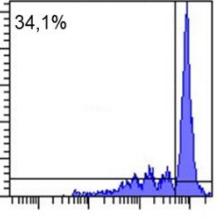
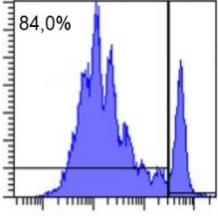
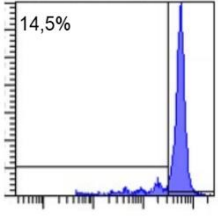
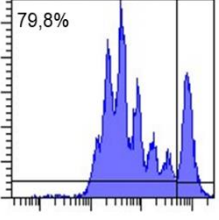
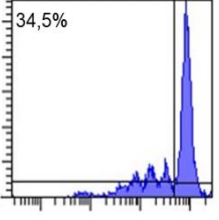
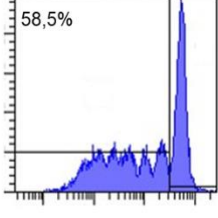
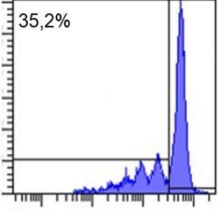
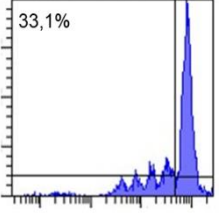
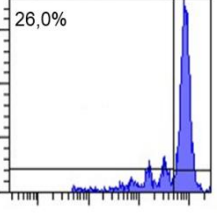
Es lässt sich eine tendenziell erhöhte IL-17-IFN $\gamma$ -Produktion in den Patienten feststellen.

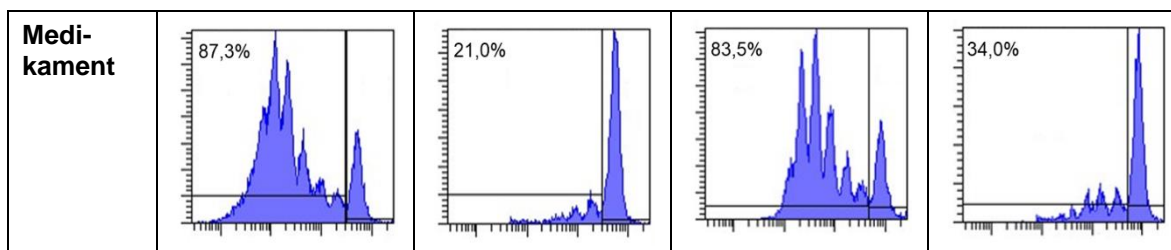
HC = Healthy Control, JIA = juvenile idiopathische Arthritis.

## 4.5 Suppressions-Assay

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der durchgeführten Suppressions-Assays dargestellt. Hierbei werden zunächst die für die Assays verwendeten Probanden dargestellt und charakterisiert. Danach werden die Ergebnisse der JIA- und Kontrollgruppe gesondert betrachtet. Abschließend werden diese beiden Gruppen auf Unterschiede in den Ergebnissen überprüft. Zunächst wird in Tabelle 52 das Beispiel eines Suppressions-Assay für je eine gesunde Kontrolle und einen JIA-Patienten für die jeweiligen Stimuli abgebildet.

**Tabelle 52: Suppressions-Assay einer gesunden Kontrolle (HC) und eines Patienten (JIA)**

Stimulus	HC		JIA	
	0 Tregs : 1 PBMCs	1 Tregs : 1 PBMCs	0 Tregs : 1 PBMCs	1 Tregs : 1 PBMCs
<b>Un-stimuliert</b>				
<b>Anti-CD3, anti-CD28</b>				
<b>IL-17</b>				
<b>Anti-IL-17</b>				
<b>Th17</b>				



X-Achse: CFSE-Menge; Y-Achse: Zellzahl

Prozentangaben der proliferierten Lymphozyten anteilig an allen CFSE-markierten Lymphozyten.

Die Inhibition der PBMC-Proliferation durch die Tregs sowohl in HC als auch in JIA wird in der 1:1-Kultur deutlich. Bemerkenswert ist eine niedrigere Proliferationssuppression im Th17-Milieu in beiden Gruppen verglichen mit der Positivkontrolle (anti-CD3/anti-CD28).

#### 4.5.1 Charakterisierung der Probandengruppen für die Suppressions-Assays

Für die Suppressions-Assays wurden die Proben der in Tabelle 53 demographisch beschriebenen 5 Patienten- und 7 Kontrollprobanden mit möglichst viel vorhandenem (eingefrorenen) Probenmaterial zur Sicherstellung einer für die Kulturversuche ausreichenden Zellzahl verwendet.

**Tabelle 53: Demographische Beschreibung der Patienten (JIA)- und Kontrollkohorte (HC) der Suppressions-Assays**

	JIA		HC		P-Wert
	N	Häufigkeit in %	N	Häufigkeit in %	
Männlich	3	60	1	14,3	
Weiblich	2	40	6	85,7	
	M ± SD	Median (Min.-Max.)	M ± SD	Median (Min.-Max.)	
Alter in Jahren bei Blutentnahme	16,0 ± 5,0	17,0 (8-20)	22,9 ± 1,9	23,0 (19-25)	<b>0,010</b>
Alter in Jahren bei Diagnose	4,6 ± 3,1	4,0 (2-10)	-	-	-
Krankheitsdauer in Jahren	11,4 ± 4,7	13,0 (4-16)	-	-	-

M = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min. = Minimalwert; Max. = Maximalwert

##### 4.5.1.1 Charakterisierung der Patientenkohorte

Für die Suppressions-Assays wurden Blutproben von 5 Patienten mit extended Oligarthritis verwendet. Davon erhielt 1 Patient lediglich ein NSAR, 1 Patient lediglich MTX als Basistherapie. Die anderen 3 Patienten erhielten zu ihrer konventionellen Basistherapie außerdem ein Biologikum.

Alle Patienten hatten ein negatives CRP, die BSG war bei allen Patienten im Normbereich. 1 Patient hatte leicht erniedrigte Leukozyten, 1 Patient eine leicht erhöhte absolute Lymphozytenzahl. Alle Patienten waren RF und HLA-B27 negativ, 3 waren ANA positiv (vgl. Tabelle 54).

**Tabelle 54: Laborwerte der Patientenkohorte der Suppressions-Assays**

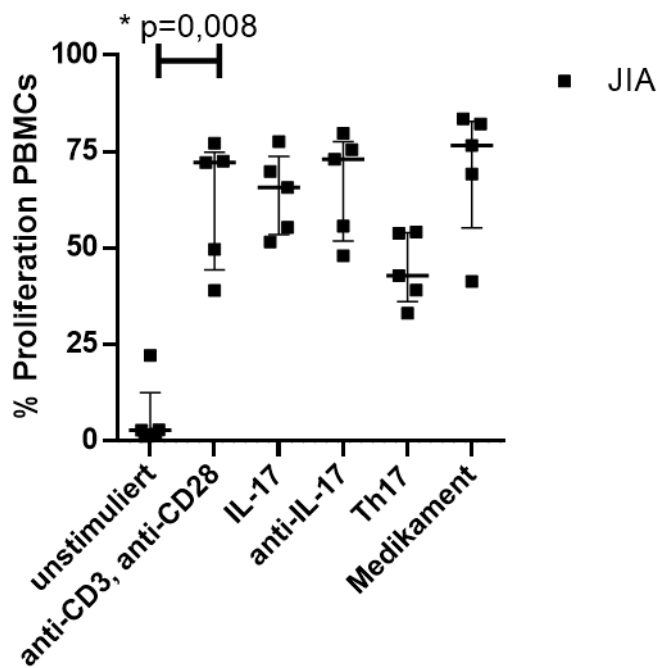
<b>Laborwert</b>	<b>Referenzbereich</b>	<b>M ± SD</b>	<b>Median (Min.-Max.)</b>
CRP (mg/dl)	<0,5	0,03 ± 0,06	0,0 (0-0,15)
BSG (mm/h)	<15-20mm/h	3 ± 1,3	2 (2-5)
Leukozyten/µl	4800-10000	6300 ± 1257,0	6100 (4400-8300)
Lymphozyten absolut (G/l)	1,2-3,4	2,5 ± 0,7	2,3 (1,8-3,7)
Lymphozyten relativ (%)	26-46	40,4 ± 4,5	42,4 (32,4-44,8)
Thrombozyten/µl	150000-450000	245600 ± 28834,7	234000 (217000-300000)

M = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min. = Minimalwert; Max. = Maximalwert

#### **4.5.2 Einfluss der Stimuli auf die Suppressionsfähigkeit der Tregs in der JIA-Gruppe**

Im Vergleich der verschiedenen Stimuli untereinander wurde besonders Wert auf die unterschiedlichen Einflüsse im Vergleich zur Positivkontrolle gelegt. Da anti-CD3 und anti-CD28 außer bei der Negativkontrolle zu allen Stimuli dazu gegeben wurden, wurde der Mann-Whitney-U-Test innerhalb der Patientenkohorte immer im Vergleich zur Positivkontrolle durchgeführt.

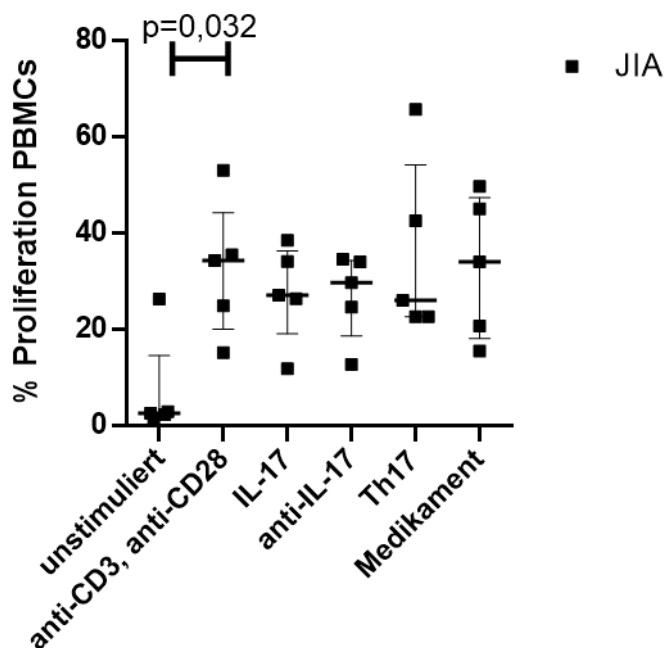
Bei der Proliferation der PBMCs in der 1:0 Kultur ohne Treg-Einfluss ergab sich in Gegenüberstellung mit der Positivkontrolle ein signifikant niedrigerer Anteil der vermehrten (entspricht CFSE<sup>-</sup>) PBMC-Population in der Negativkontrolle (p = 0,008) sowie eine nicht signifikant (p = 0,222) niedrigere Proliferation im Th17-Milieu (vgl. Tabelle 55). Abbildung 32 veranschaulicht diesen Zusammenhang.



**Abbildung 32: Anteil der proliferierten PBMCs in der 1:0-Kultur der Patientenkohorte**

Darstellung in % mit Median und Interquartilrange. JIA = juvenile idiopathische Arthritis. Während das Th17-Milieu lediglich eine Tendenz zur niedrigeren PBMC-Proliferation aufwies ( $p = 0,222$ ), ließ sich in den unstimulierten Proben eine signifikant verminderte Proliferation im Vergleich zur Positivkontrolle feststellen (\* als signifikanter Wert auch nach Bonferroni-Korrektur mit Signifikanzniveau 0,01).

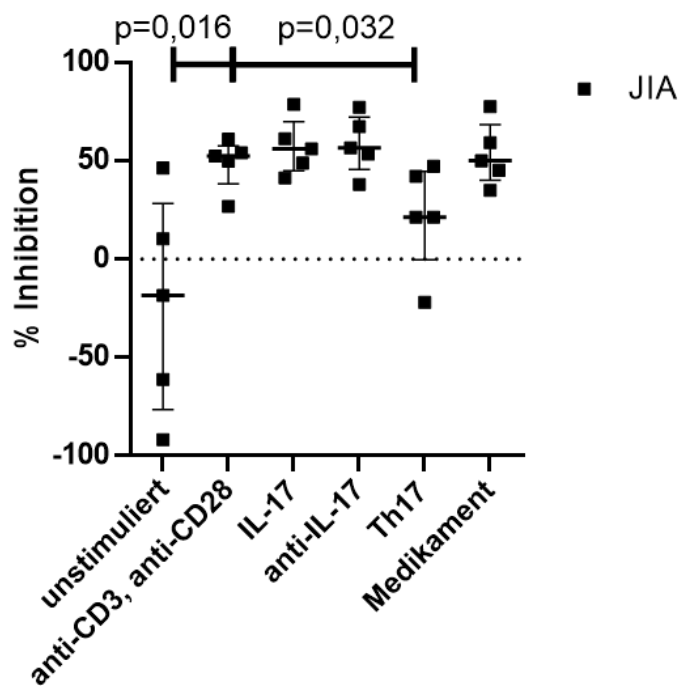
In der Betrachtung der PBMC-Proliferation unter Treg-Einfluss, also in der 1:1-Kultur, ergaben sich ähnliche Verhältnisse: Auch hier war eine signifikante Proliferationsminderung gegenüber der anti-CD3/anti-CD28-Proben lediglich bei den unstimulierten Proben ersichtlich ( $p = 0,032$ ) (vgl. Abbildung 33, Tabelle 55).



**Abbildung 33: Anteil der proliferierten PBMCs in der 1:1-Kultur der Patientenkohorte**

Darstellung in % mit Median und Interquartilrange JIA = juvenile idiopathische Arthritis. Ein signifikanter Unterschied war lediglich in einer Verminderung der PBMC-Proliferation bei den unstimulierten Proben im Vergleich zu den anti-CD3/CD28 Proben feststellbar (p-Wert jedoch oberhalb des Signifikanz-Niveaus von 0,01 nach Bonferroni-Korrektur).

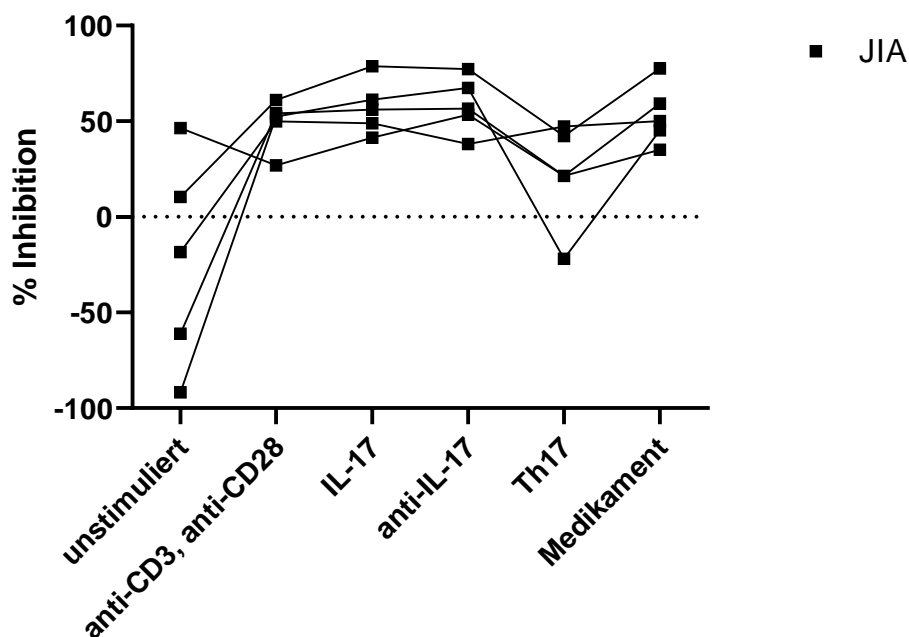
Vergleich man nun die Proliferation des 1:1-Ansatzes mit der des 1:0-Ansatzes (vgl. Rechenweg in Kapitel 3.2.12) und damit die Inhibition der Proliferation unter Treg-Einfluss, so zeigte sich eine signifikant schlechtere Inhibition in der Negativkontrolle ( $p = 0,016$ ). Ebenso war die Suppressionsfähigkeit der Tregs im proinflammatorischen Umgebungsmilieu des Th17-Cocktails signifikant erniedrigt ( $p = 0,032$ ). Im Gegensatz dazu spiegelten die anderen Kulturbedingungen (IL-17, anti-IL-17 und Medikament) keine Veränderung in der Funktionsfähigkeit der Tregs wider (vgl. Tabelle 55). In Abbildung 34 und Abbildung 35 ist je die Inhibitionsfunktion der Tregs dargestellt.



**Abbildung 34: Suppressions-Assay Patientenkohorte**

Darstellung in % mit Median und Interquartilrange JIA = juvenile idiopathische Arthritis. Darstellung der prozentualen Inhibition unter Treg-Einfluss im Vergleich zur Proliferation reiner PBMCs je nach Kulturmilieu. Der suppressive Einfluss der Tregs auf die PBMCs im unstimulierten Milieu und im Th17-Polarisationscocktail war signifikant vermindert, jedoch zeigten sich die P-Werte nach Bonferroni-Korrektur oberhalb des entsprechenden Signifikanzniveaus von 0,01.





**Abbildung 35: Suppressions-Assays der einzelnen Patienten**

In der Abbildung werden die einzelnen Werte der Proliferations-suppression (% Inhibition) der PBMCs durch die Tregs nach Patienten (n=5) dargestellt. Deutlich wird eine stark verminderte Inhibitionsfunktion der Tregs im Th17-Milieu.

JIA = juvenile idiopathische Arthritis.

**Tabelle 55: Werte der PBMC-Proliferation im 1:0- und 1:1-Co-Kultur-Ansatz sowie Inhibition der Proliferation durch Tregs in Patienten**

Stimulus		JIA	P-Wert
unstimuliert	Proliferation PBMCs im 1:0-Ansatz	6,18 ± 8,98 (2,80; 1,20-22,20)	<b>0,008*</b>
	Proliferation PBMCs im 1:1-Ansatz	7,12 ± 10,73 (2,60; 1,50-26,30)	0,032
	Inhibition PBMC-Proliferation durch Tregs im 1:1-Ansatz	-22,89 ± 55,05 (-18,49; - 91,67-46,43)	0,016
Anti-CD3, anti-CD28	Proliferation PBMCs im 1:0-Ansatz	62,12 ± 16,77 (72,20; 39,00-77,20)	-
	Proliferation PBMCs im 1:1-Ansatz	32,58 ± 14,05 (34,30; 15,20-53,00)	-
	Inhibition PBMC-Proliferation durch Tregs im 1:1-Ansatz	48,87 ± 12,95 (52,49; 26,90-61,03)	-
IL-17	Proliferation PBMCs im 1:0-Ansatz	64,04 ± 10,61 (65,70; 51,60-77,60)	1,000
	Proliferation PBMCs im 1:1-Ansatz	27,58 ± 10,15 (27,10; 11,80-38,50)	0,690
	Inhibition PBMC-Proliferation durch Tregs im 1:1-Ansatz	57,24 ± 14,14 (56,06; 41,40-78,70)	0,548
Anti-IL-17	Proliferation PBMCs im 1:0-Ansatz	66,40 ± 13,77 (73,00; 48,00-79,80)	0,548
	Proliferation PBMCs im 1:1-Ansatz	27,12 ± 9,00 (29,70; 12,70-34,60)	0,421

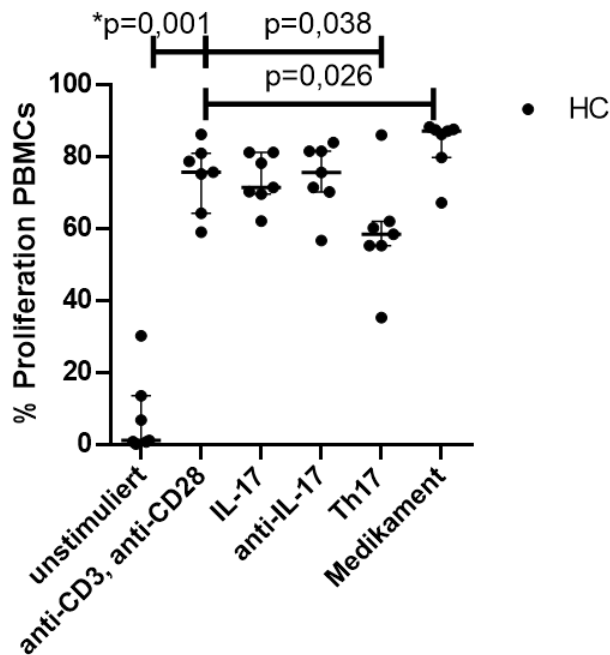
Stimulus		JIA	P-Wert
	Inhibition PBMC-Proliferation durch Tregs im 1:1-Ansatz	58,56 ± 14,78 (56,64; 38,13-77,20)	0,310
<b>Th17</b>	Proliferation PBMCs im 1:0-Ansatz	44,64 ± 9,27 (42,90; 33,10-54,20)	0,222
	Proliferation PBMCs im 1:1-Ansatz	35,90 ± 18,61 (26,00; 22,60-65,70)	1,000
	Inhibition PBMC-Proliferation durch Tregs im 1:1-Ansatz	22,10 ± 27,28 (21,45; -21,89-47,32)	0,032
<b>Medikament</b>	Proliferation PBMCs im 1:0-Ansatz	70,58 ± 17,26 (76,60; 41,40-83,50)	0,421
	Proliferation PBMCs im 1:1-Ansatz	32,98 ± 14,84 (34,00; 15,50-49,70)	1,000
	Inhibition PBMC-Proliferation durch Tregs im 1:1-Ansatz	53,45 ± 16,07 (50,00; 35,12-77,60)	1,000

Angabe in Mittelwert ± Standardabweichung (Median; Minimum-Maximum) in Prozent n = 5 für JIA; P-Werte als Vergleich zwischen Positivkontrolle (anti-CD3, anti-CD-28) und den anderen Stimuli (Mann-Whitney-U Test); \* = P-Wert unterhalb des Signifikanzniveaus nach Bonferroni-Korrektur. JIA = juvenile idiopathische Arthritis.

#### 4.5.3 Einfluss der Stimuli auf die Suppressionsfähigkeit der Tregs in der Kontrollgruppe

Analog zur Patientengruppe wurde auch die Kontrollgruppe auf signifikante Unterschiede mittels Mann-Whitney-U-Test untersucht und hierzu jeder Stimulus mit der Positivkontrolle verglichen.

Bei der Betrachtung der PBMC-Proliferation im 1:0-Ansatz fiel auf, dass gegenüber der Positivkontrolle zum einen die Proliferation im unstimulierten Ansatz und im Th17-Polarisationscocktail signifikant vermindert war ( $p = 0,001$  bzw.  $0,038$ ). Zum anderen, dass im Medikamentenansatz die Proliferation signifikant gesteigert war ( $p = 0,026$ ) (vgl. Tabelle 56). Diese Zusammenhänge sind in Abbildung 36 dargestellt.

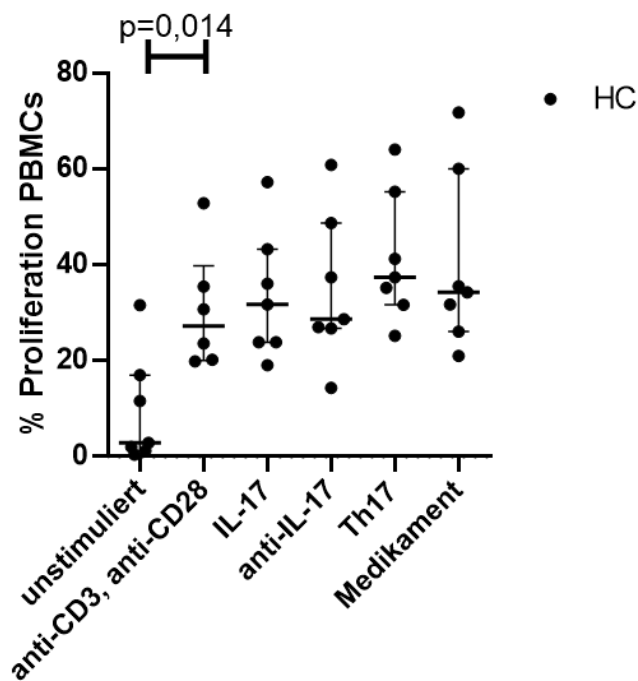


**Abbildung 36: Anteil der proliferierten PBMCs in der 1:0-Kultur der Kontrollkohorte**

Darstellung in % mit Median und Interquartilrange. HC = Healthy Control.

Die Darstellung verdeutlicht die signifikant verminderte Proliferation in der Negativkontrolle und im Th17-Ansatz, sowie die signifikant erhöhte Proliferation der PBMCs in den Proben mit Medikamentenzugabe. Nach Bonferroni-Korrektur verblieb der Unterschied zwischen unstimuliert und Positivkontrolle signifikant (\*).

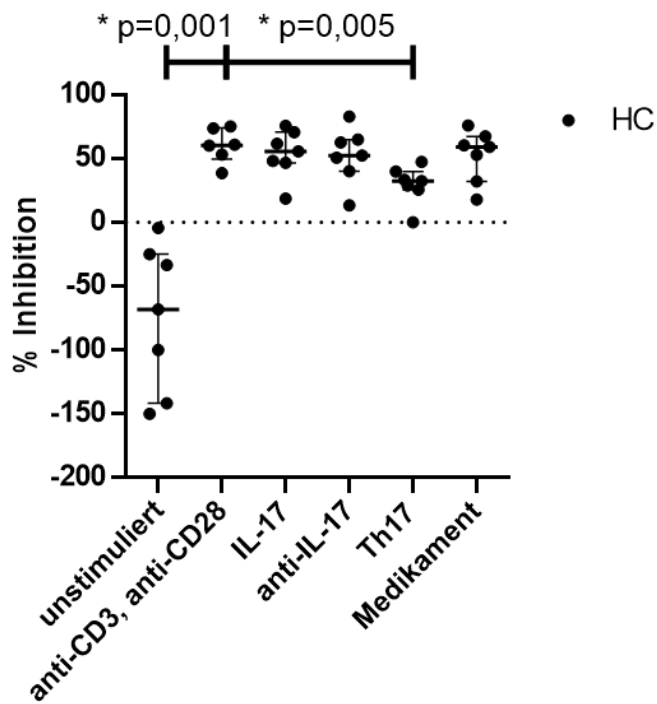
In der Auswertung der prozentualen PBMC-Proliferation im 1:1-Ansatz, d.h. unter Treg-Einfluss, spiegelte sich lediglich eine im Vergleich zur Positivkontrolle signifikant verminderte Proliferation der Negativkontrolle wider ( $p = 0,014$ ). Weiterhin zeigte sich eine tendenziell erniedrigte Proliferation im Th17-Stimulus ( $p = 0,101$ ) (vgl. Tabelle 56). Zu erwähnen ist hierbei, dass die Positivkontrolle im 1:1-Ansatz bei einer Kontrolle aus methodischen Gründen aus der Wertung gestrichen wurde und daher für das anti-CD3/-CD28-Milieu mit  $n = 6$  statt  $n = 7$  gerechnet wurde (vgl. Abbildung 37).



**Abbildung 37: Anteil der proliferierten PBMCs in der 1:1-Kultur der Kontrollkohorte**

Darstellung in % mit Median und Interquartilrange. HC = Healthy Control. Lediglich im Vergleich zwischen Positiv- und Negativkontrolle ergab sich eine signifikant verminderte PBMC-Proliferation. Der P-Wert lag jedoch oberhalb des Signifikanzniveaus von 0,01 nach Bonferroni-Korrektur.

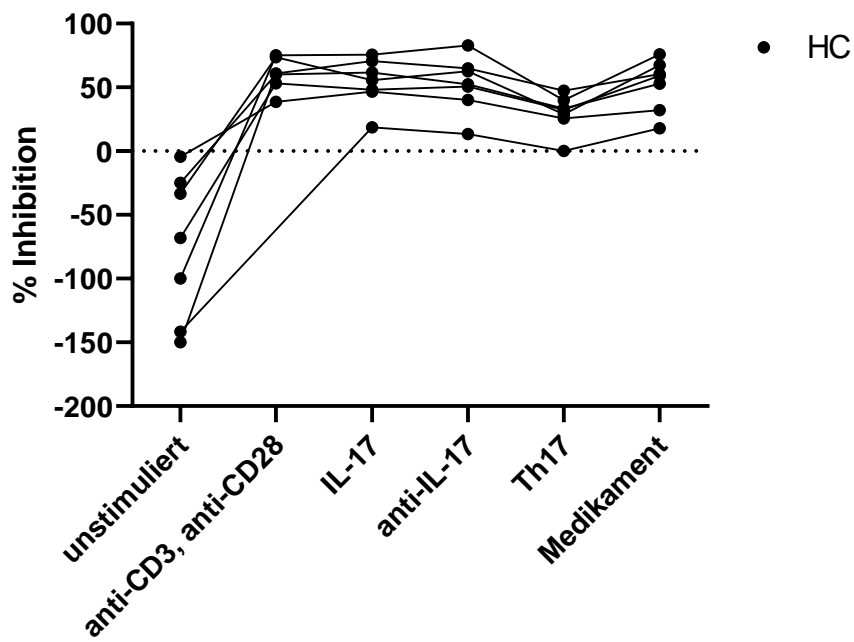
Im Vergleich des 1:1- mit dem 1:0-Ansatz sind auch hier zum einen der signifikante Unterschied zwischen Negativ- und Positivkontrolle zu benennen ( $p = 0,001$ ) und zum anderen der zwischen Positivkontrolle und Th17-Polarisationscocktail ( $p = 0,005$ ). Sowohl bei der Negativkontrolle als auch dem Th17-Cocktail war die Inhibition der PBMC-Proliferation durch die Tregs weniger stark ausgeprägt. In den übrigen Kulturbedingungen konnten keine relevanten Unterschiede hinsichtlich der Treg-Suppressionsfunktion festgestellt werden. Entsprechend der Darstellung der Patientenkohorte in Kapitel 4.5.2 werden die Ergebnisse der Suppressions-Assays in der Gruppe der gesunden Kontrollen zunächst in der Abbildung 38 und der Abbildung 39 abgebildet und im Anschluss die statistischen Werte der Suppressions-Assays in Tabelle 56 aufgelistet. Zu beachten ist wiederum, dass beim Vergleich der Stimulantien mit der Positivkontrolle für die Positivkontrolle  $n = 6$ , für alle anderen Stimulantien  $n = 7$  gilt.



**Abbildung 38: Suppressions-Assay Kontrollkohorte**

Darstellung in % mit Median und Interquartilrange. HC = Healthy Control.

In der Abbildung ist die prozentuale Inhibition der PBMC-Proliferation unter Treg-Einfluss im Vergleich zur Proliferation der PBMCs ohne Tregs dargestellt, aufgeteilt nach Stimulus. Gut ersichtlich ist die signifikante Minderung der Suppressionsfunktion der Tregs im unstimulierten und Th17-Medium, beide Unterschiede zeigten sich auch nach Bonferroni-Korrektur (Signifikanzniveau von 0,01) als signifikant (\*).



**Abbildung 39: Suppressions Assays der einzelnen gesunden Probanden**

In der Abbildung sind die Inhibitionswerte in % nach Kontrollen (n=7, Ausnahme: aCD3/28 n=6) dargestellt. Sie entsprechen der Suppression der PBMCs durch die Tregs. Auch in dieser Kohorte zeigt sich eine verminderte Suppressionsfunktion im Th17-Kulturmilieu. HC = Healthy Control.

**Tabelle 56: Werte der PBMC-Proliferation im 1:0- und 1:1-Co-Kultur-Ansatz sowie Inhibition der Proliferation durch Tregs in Kontrollen**

Stimulus		HC	P-Wert
<b>unstimuliert</b>	Proliferation PBMCs im 1:0-Ansatz	7,70 ± 11,09 (1,20; 0,20-30,30)	<b>0,001*</b>
	Proliferation PBMCs im 1:1-Ansatz	9,53 ± 11,55 (2,90; 0,40-31,60)	0,014
	Inhibition PBMC-Proliferation durch Tregs im 1:1-Ansatz	- 74,63 ± 57,70 (- 68,12; - 150,00-(- 4,29))	<b>0,001*</b>
<b>Anti-CD3, anti-CD28</b>	Proliferation PBMCs im 1:0-Ansatz	74,39 ± 9,50 (75,80; 59,10-86,30)	-
	Proliferation PBMCs im 1:1-Ansatz	30,48 ± 12,59 (27,20; 19,90-52,90)	-
	Inhibition PBMC-Proliferation durch Tregs im 1:1-Ansatz	60,25 ± 13,50 (60,49; 38,70-75,06)	-
<b>IL-17</b>	Proliferation PBMCs im 1:0-Ansatz	73,53 ± 7,08 (71,50; 62,20-81,30)	0,902
	Proliferation PBMCs im 1:1-Ansatz	33,63 ± 13,31 (31,80; 19,10-57,30)	0,534
	Inhibition PBMC-Proliferation durch Tregs im 1:1-Ansatz	53,84 ± 18,89 (55,52; 18,61-75,61)	0,731
<b>Anti-IL-17</b>	Proliferation PBMCs im 1:0-Ansatz	74,50 ± 9,42 (75,70; 56,80-84,00)	1,000
	Proliferation PBMCs im 1:1-Ansatz	34,86 ± 15,61 (28,70; 14,40-60,90)	0,628
	Inhibition PBMC-Proliferation durch Tregs im 1:1-Ansatz	52,40 ± 21,83 (52,46; 13,37-82,86)	0,628
<b>Th17</b>	Proliferation PBMCs im 1:0-Ansatz	59,03 ± 14,88 (58,50; 35,40-86,10)	0,038
	Proliferation PBMCs im 1:1-Ansatz	41,46 ± 13,66 (37,40; 25,20-64,10)	0,101
	Inhibition PBMC-Proliferation durch Tregs im 1:1-Ansatz	29,68 ± 14,88 (32,49; 0,18-47,43)	<b>0,005*</b>
<b>Medikament</b>	Proliferation PBMCs im 1:0-Ansatz	83,47 ± 7,69 (87,20; 67,30-88,40)	0,026
	Proliferation PBMCs im 1:1-Ansatz	40,10 ± 18,66 (34,30; 21,00-71,80)	0,234
	Inhibition PBMC-Proliferation durch Tregs im 1:1-Ansatz	52,19 ± 20,35 (59,10; 17,94-75,92)	0,534

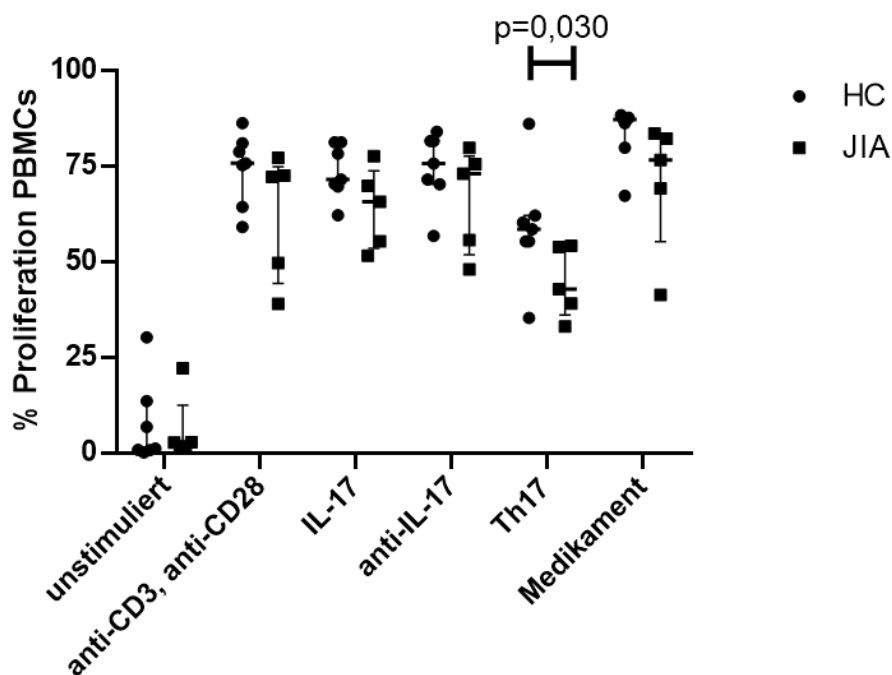
Angabe in Mittelwert ± Standardabweichung (Median; Minimum-Maximum) in Prozent  
n = 7 für HC, außer für Inhibition und Proliferation im 1:1-Ansatz des anti-CD3, anti-CD28-  
Stimulus: n = 6; P-Werte als Vergleich zwischen Positivkontrolle (anti-CD3, anti-CD-28) und den  
anderen Stimuli (Mann-Whitney-U Test); \* = P-Wert unterhalb des Signifikanzniveaus nach  
Bonferroni-Korrektur

#### 4.5.4 Vergleich der Suppressions-Assays der beiden Gruppen

Es werden nun die bereits beschriebenen Kohorten der Patienten und Kontrollen bzgl. der Ergebnisse im Suppressions-Assay miteinander verglichen. Entsprechend den beiden vorherigen Unterkapiteln wird zunächst auf den 1:0-

Kulturansatz eingegangen, dann auf die 1:1-Co-Kultur PBMC und Tregs und abschließend auf die berechnete prozentuale Inhibitionsfunktion der Tregs.

Bei der Betrachtung der Proliferation der PBMCs je nach Stimulationsmilieu (1:0-Ansatz) konnte in der Th17-Probe ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,030$ ) zwischen Patienten- und Kontrollgruppe ermittelt werden. Die PBMCs der Patienten proliferierten unter dieser Kulturbedingung im Schnitt schlechter als die der Kontrollen (vgl. Abbildung 40, Tabelle 55, Tabelle 56).



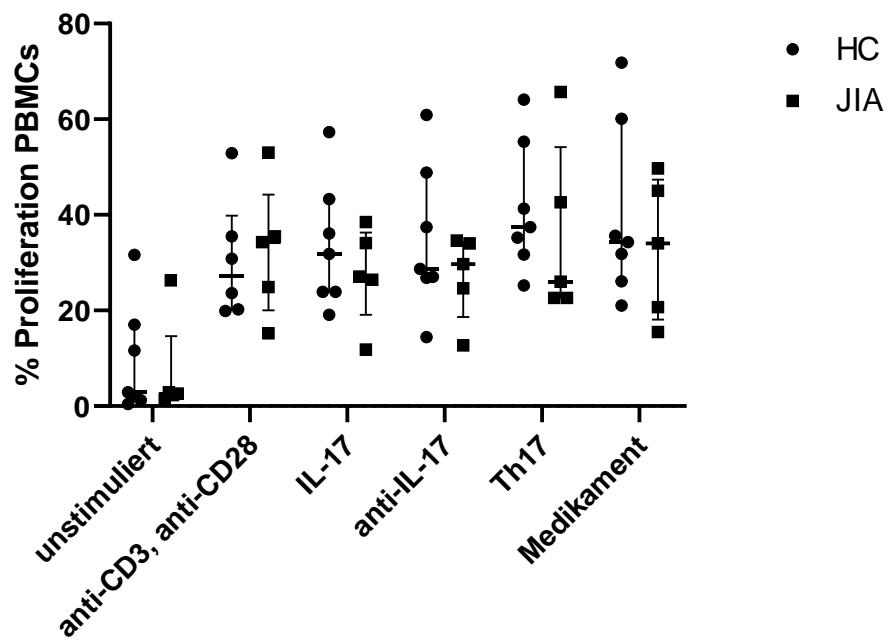
**Abbildung 40: Anteil der proliferierten PBMCs in den beiden Kohorten je nach Stimulus**

Darstellung in % mit Median und Interquartilrange. HC = Healthy Control, JIA = juvenile idiopathische Arthritis.

In der Abbildung ersichtlich ist die im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verminderte PBMC-Proliferation im Th17-Polarisationscocktail in der Patientengruppe, welche jedoch nach Bonferroni-Korrektur oberhalb des korrigierten Signifikanzniveaus von 0,01 lag.

Im 1:1-Kulturansatz ließ sich kein signifikanter Unterschied bzgl. der prozentualen Proliferation der PBMCs unter Treg-Einfluss zwischen den beiden Kohorten feststellen (vgl. Abbildung 41).

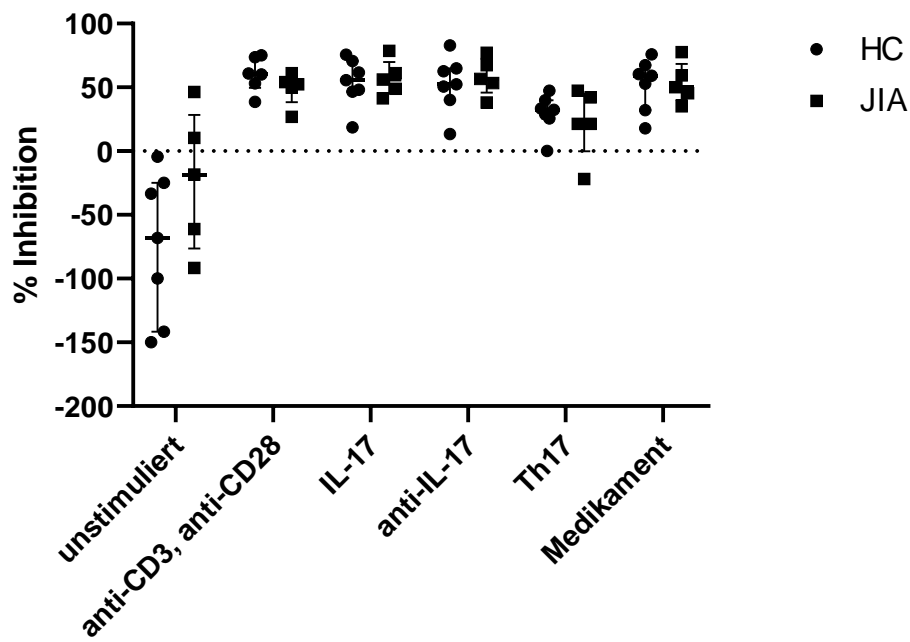




**Abbildung 41: Anteil der proliferierten PBMCs in 1:1-Cokultur mit Tregs in den beiden Kohorten je nach Stimulus**

Darstellung in % mit Median und Interquartilrange. HC = Healthy Control, JIA = juvenile idiopathische Arthritis.

Vergleicht man abschließend die Stärke der Effekte der unterschiedlichen Stimuli zwischen der JIA- und der Kontrollgruppe auf die Inhibitionsfunktion, so lässt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied feststellen (vgl. Abbildung 42).



**Abbildung 42: Vergleich Suppressions-Assays zwischen JIA- und Kontrollkohorte**

Darstellung in % mit Median und Interquartilrange

Die Abbildung veranschaulicht die prozentuale Inhibitionsfunktion der Tregs je nach Stimulus zwischen den beiden untersuchten Gruppen. Die signifikanten Suppressionsminderungen in unstimuliertem und Th17-Milieu sind sowohl in der Patienten-, als auch der Kontrollkohorte erkennbar. Zwischen den beiden Gruppen selbst besteht kein signifikanter Unterschied der Änderung der Suppressionsfähigkeit der Tregs.

## 4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die PBMC-Charakterisierung zeigte eine Verschiebung der Treg-Th17-Balance hin zu vermehrten Th17-Zellen und Th17-like Tregs innerhalb der JIA-Gruppe. Weiterhin zeigte sich eine vermehrte Zytotoxizität und vermehrte Expression des Migrations-Markers CXCR3 insbesondere in den naiven T-Zellen in der Patientengruppe (vgl. Tabelle 57).

**Tabelle 57: Zusammenfassung der Ergebnisse der PBMC-Charakterisierung**

		<b>JIA (vs. HC)</b>	<b>EAA (vs. JIA, deskriptiv)</b>
<b>Allgemeiner Lymphozytenpool</b>	CD4 <sup>+</sup>	CXCR3 ↑, CCR6 ↑; CXCR3CCR6 ↑ CXCR3 in Naive und Memory ↑ CCR6 in allen Subpopulationen ↑	CCR7 ↑, CXCR3 ↓, CCR6 ↓
	CD8 <sup>+</sup>	CXCR3 ↑, CXCR3CCR6 ↑ CXCR3 und CCR6 in Naive ↑	CCR7 ↑, CXCR3 ↓, CCR6 ↓
<b>Zytotoxizität</b>	CD4 <sup>+</sup>	Perforin in Naive und Memory ↑ GranzymB in Naive ↑ PerforinGranzymB ↑	Perforin und GranzymB in Effektor und TEMRA ↑
	CD8 <sup>+</sup>	Perforin in Memory ↑	Perforin und GranzymB in Effektor und TEMRA ↑
	unstimuliert	GranzymB in CD4 <sup>+</sup> -Effektor ↓ GranzymB in CD4 <sup>+</sup> -TEMRA ↑ Ansonsten ähnliche Ergebnisse wie nach Stimulation mit PMA/Ionomycin/Brefeldin A	Ähnliche Ergebnisse wie nach Stimulation mit PMA/Ionomycin/Brefeldin A
<b>Th1/Th17-Balance</b>	CD4 <sup>+</sup>	IL-17 ↑ CCR6 ↑, CD161 ↑, CCR6CD161 ↑ IFN $\gamma$ in CCR6 ↓	IL-17 ↑, auch in Subpopulationen CCR6 ↓, CD161 ↓, CCR6CD161 ↓
	CD8 <sup>+</sup>	CCR6 ↑, CCR6CD161 ↑ IFN $\gamma$ und TNF $\alpha$ in CD161 ↑	IL-17 ↑, auch in Subpopulationen CCR6 ↓, CD161 ↓, CCR6CD161 ↓
<b>Tregs</b>	CD4 <sup>+</sup>	IL-10 in Tregs ↑	Tregs ↓ IL-10 in CD4 <sup>+</sup> , in CCR6 und in Tregs ↑
	CD8 <sup>+</sup>	IL-10 ↑, IL-10 in CCR6 ↑	IL-10 und FoxP3 ↑ IL-10 in CCR6 und in FoxP3 ↓, FoxP3 in CCR6 ↑
<b>Treg/Th17-Balance</b>	CD4 <sup>+</sup>	IL-17 und CCR6 in FoxP3 ↑ ROR $\gamma$ t in CD4 <sup>+</sup> und in CCR6 ↓ IL-17 in ROR $\gamma$ t ↑	IL-17 in FoxP3, FoxP3CCR6 und in ROR $\gamma$ t ↑ CCR6 in FoxP3 ↓

In der Spalte JIA sind die signifikanten Ergebnisse im Vergleich zu HC dargestellt, in der Spalte EAA die Ergebnisse im Vergleich zu oligo-/polyarthritischer/UD-JIA deskriptiv beschrieben.  
 ↑ bedeutet: jeweilige Population in der JIA-Gruppe (verglichen mit HC) erhöht, respektive in den EAA-Proben (verglichen mit der JIA-Gruppe) erhöht.  
 HC = Healthy Control, JIA = juvenile idiopathische Arthritis, EAA = Enthesitis-assoziierte Arthritis.

Die durchflusszytometrische Charakterisierung der Tregs nach Kultur zeigte im Th17-Ansatz verglichen mit der Negativkontrolle eine vermehrte Expression der

Treg-Charakteristika. In der JIA-Gruppe zeigte der Medikamentenansatz im Vergleich zum Th17-Milieu eine (wieder der HC-Gruppe entsprechende) erniedrigte FoxP3-Expression. Die Ausprägung der Treg-Charakteristika war im Schnitt in allen Stimuli in der JIA-Gruppe verglichen mit der HC-Gruppe (teils signifikant) vermehrt. Die IL-17<sup>+</sup> Zellen waren ebenfalls in der JIA-Gruppe vermehrt (vgl. Tabelle 58).

**Tabelle 58: Zusammenfassung der Ergebnisse der Treg-Charakterisierung**

		positiv	IL-17	Anti-IL-17	Th17	Medikament	JIA vs. HC
• FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	JIA			↑*	↑	<sup>a</sup>	↑ <sup>b</sup>
	HC				↑ (n.s.)		
• C25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> • C25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup>	JIA				↑ (n.s.)		↑ (n.s.)
	HC				↑ (n.s.)		
• CCR6 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> • CCR6 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	JIA	↑ (n.s.) <sup>c</sup>		↑ (n.s.)			
	HC						
• IL-17 <sup>+</sup> in CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> • IL-17 <sup>+</sup> in CCR6 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> • IL-17 <sup>+</sup> in FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	JIA				↓ (n.s.)		↑ (n.s.)
	HC						
• IL-17 <sup>+</sup> IFNγ <sup>+</sup> in CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> • IL-17 <sup>+</sup> IFNγ <sup>+</sup> in CCR6 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> • IL-17 <sup>+</sup> IFNγ <sup>+</sup> in FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	JIA						i.d.R. ↑ (n.s.)
	HC						

Vergleich der einzelnen Stimuli mit der Negativkontrolle (= unstimuliert)

Letzte Spalte: Vergleich JIA-Proben zu HC-Proben je Stimulus (↑ bedeutet erhöhte Spiegel in JIA-Probanden im Vergleich zu HC-Probanden)

HC = Healthy Control, JIA = juvenile idiopathische Arthritis

positiv = anti-CD3, anti-CD28

n.s.: nicht signifikant

<sup>a</sup> Im Vergleich zum Th17-Milieu zeigte sich eine signifikant erniedrigte FoxP3-Expression in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen im Medikamentenstimulus.

<sup>b</sup> Eine signifikant höhere Anzahl an FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen in den JIA-Probanden im Vergleich mit HC-Proben fand sich im anti-IL-17- und Th17-Ansatz.

<sup>c</sup> Eine nicht signifikante Erhöhung von CCR6<sup>+</sup>-Zellen zeigte sich nur in der CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation.

\* P-Wert verbleibt nach Bonferroni-Korrektur signifikant (Signifikanzniveau 0,003)

Die Ergebnisse der einzelnen Stimuli im Suppressions-Assay wurden jeweils mit der Positivkontrolle verglichen, da hier die Standardproliferation abgelesen wurde. Die Proliferation der PBMCs zeigte sich in beiden Kohorten nach Th17-induzierender Stimulation deutlich vermindert. Zeitgleich ließ sich auch eine

signifikant verminderte Inhibition der PBMC-Proliferation durch die Tregs im Th17-Milieu feststellen (vgl. Tabelle 59).

**Tabelle 59: Zusammenfassung der Ergebnisse der Suppressions-Assays**

		IL-17	Anti-IL-17	Th17	Medikament	JIA vs. HC
<b>Proliferation</b>	JIA	=	=	↓ (n.s.)	=	Th17 ↓ alle anderen Stimuli ↓ (n.s.)
	HC	=	=	↓	↑	
<b>Proliferation unter Treg-Einfluss</b>	JIA	=	=	=	=	=
	HC	=	=	↓ (n.s.)	↑ (n.s.)	
<b>Inhibition</b>	JIA	=	=	↓	=	=
	HC	=	=	↓*	=	

Vergleich der einzelnen Stimuli mit der Positivkontrolle (anti-CD3, anti-CD28)

Letzte Spalte: Vergleich JIA-Proben zu HC-Proben je Stimulus (↓ bedeutet geringere Proliferation in JIA-Probanden im Vergleich zu HC-Probanden)

Proliferation = Proliferation PBMCs in 1:0-Kultur

Proliferation unter Treg-Einfluss = Proliferation PBMCs in 1:1-Co-Kultur mit Tregs

Inhibition = Vergleich Proliferation PBMCs unter Treg-Einfluss mit Proliferation PBMCs

n.s.: nicht signifikant; = bedeutet kein Unterschied

\* P-Wert verbleibt nach Bonferroni-Korrektur signifikant (Signifikanzniveau 0,01)

## **5 Diskussion**

### **5.1 Interpretation der Unterschiede im Lymphozytenpool zwischen den einzelnen Probengruppen**

In der PBMC-Charakterisierung wurde der Lymphozytenpool der JIA-Proben und der gesunden Kontrollen analysiert und verglichen. Außerdem wurden die beiden EAA-Proben deskriptiv mit den anderen JIA-Subtypen verglichen.

#### **5.1.1 Unterschiede im allgemeinen T-Zell-Lymphozytenpool**

Im allgemeinen T-Zell-Lymphozytenpool zeigte sich eine signifikant erhöhte Anzahl an CXCR3-positiven CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, CCR6-positiven CD4<sup>+</sup>-Zellen, sowie an CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-doppelt positiven CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in der Patientenpopulation. Auch die CCR7<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen waren tendenziell erhöht.

Die höhere Rate an CCR7<sup>+</sup>-„antigen-unerfahrenen“ Zellen, bei denen noch ein Homing in das lymphatische System erfolgen kann [7], korreliert auch mit der relativ höheren Anzahl an naiven Zellen bei den JIA-Patienten. Eine mögliche Erklärung wäre das signifikant jüngere Alter bei den Patienten der PBMC-Charakterisierung. Die EAA-Probanden waren ebenfalls im Schnitt jünger als die JIA-Gruppe, mit konkordant erhöhtem Anteil an CCR7<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen. Die durchschnittlich älteren Kontrollprobanden haben vermutlich bereits eine weitere Reifung des Immunsystems durchlaufen, z.B. indem einige Infektionen durchgemacht worden sind. Zu beachten ist, dass die Verwendung von CCR7 als T-Zell-Differenzierungsmarker bei zuvor gefrorenen Proben, wie hier verwendet, in manchen Arbeiten als kritisch angesehen wird [9], da eine vermehrte CCR7-Expression in gefrorenen Proben im Vergleich zu frischen Proben festgestellt wurde [93].

Die CCR6-Expression in den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen war in allen Reifegraden in der Patientengruppe erhöht. Die Expression sollte laut bekannter Literatur in Naiven- und TEMRA-Zellen generell niedriger sein [94]. Die stark erhöhte CCR6-Expression in den CD4<sup>+</sup>-Patientenzellen in diesen Subpopulationen könnte zum

einen mit einer hohen Migrationsfähigkeit korrelieren oder einen Hinweis auf die Rolle der Th17-Zell-Antwort in der Pathogenese der JIA geben, da CCR6 neben der Funktion als Chemokinrezeptor für u.a. CCL20 auch als bewährter Th17-Marker fungiert [3, 10] (vgl. auch Kapitel 1.1.1.3). Überraschenderweise war die CCR6-Expression der T-Zellen der EAA-Probanden vergleichsweise niedrig. Studien fanden erhöhte IL-17-Spiegel in der Synovialflüssigkeit von EAA-Patienten, welche auf eine Th17-assoziierte Pathogenese hinweisen [55]. Wir untersuchten hingegen periphere Blutzellen, was eine Erklärung für den nicht erhöhten Anteil der CCR6-positiven Zellen in den EAA-Patienten sein könnte.

Die erhöhte CXCR3-Expression in den CD4<sup>+</sup>-Zellen der Patienten deutet auf eine erhöhte Migrationsfähigkeit der Zellen zu entzündeten Gebieten hin [94]. Außerdem wird der Chemokinrezeptor als typischer Oberflächenmarker für Th1-Zellen angesehen [3, 10]. Wedderburn et al. fanden vermehrt CXCR3<sup>+</sup>-Lymphozyten in der Synovialflüssigkeit von JIA-Patienten [52]. Außerdem fand man in entzündetem Synovia-Gebiet vermehrt aktivierte Memory-CD4<sup>+</sup>-Zellen [95]. Kongruent hiermit könnte v.a. die in unseren Experimenten gezeigte starke CXCR3-Expression in den Naiven- und Memory-CD4<sup>+</sup>-Zellen verglichen mit den gesunden Kontrollen darauf hindeuten, dass diese Zellen eine verstärkte Migration in inflammatorische Areale vermitteln und somit zur Pathogenese der Arthritis beitragen.

Insgesamt werden hyperproliferative, proinflammatorische Memory-CD4<sup>+</sup>-Zellen mit Th1/Th17-Phänotyp als wichtiger Aspekt der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis diskutiert [96]. Die jeweils erhöhte Expression von CXCR3 und CCR6 in den Memory-CD4<sup>+</sup>-Zellen der JIA-Gruppe spiegeln diesen Aspekt wider.

## **5.1.2 Unterschiede bzgl. der Zytotoxizität der Lymphozyten**

### *5.1.2.1 Unterschiede nach PMA/Ionomycin/Brefeldin A-Stimulation*

Die gesamten Granzym B<sup>+</sup>Perforin<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen waren in der JIA-Kohorte signifikant erhöht. Weiterhin lag eine gesteigerte Zytotoxizität in den Naiven- und Memory-Zellen vor.

Die genaue Funktion der TEMRA-Zellen ist bisher noch unklar. Eine Expansion dieser Zellpopulation nach Viursinfekten wie CMV wird vermutet und ein protektiver Effekt gegenüber viralen Pathogenen wird diskutiert [97]. Allerdings war der CMV-Serostatus bei unseren Probanden nicht bekannt. TEMRA-Zellen charakterisieren sich zusätzlich durch eine erhöhte CXCR3- und Granzym B sowie Perforin-Expression, welche ihr zytotoxisches Potential verdeutlichen [97]. Verglichen mit den anderen Subpopulationen (Naive-, Memory-, Effektor-Zellen) konnten auch wir ein hohes zytotoxisches Potential der TEMRA-Zellen in sowohl Kontroll- als auch JIA-Proben ermitteln, jedoch besaß die JIA-Gruppe, trotz höherer TEMRA-Zahl ein tendenziell eher niedrigeres zytotoxisches Profil der CD4<sup>+</sup>TEMRA-Zellen. Dies könnte auf eine geringere Effektivität der TEMRAs hinweisen. Alternativ kann ein Einfluss auf die Zytotoxizität durch konventionelle DMARDs vorliegen.

Die signifikant gesteigerte Zytotoxizität der CD4<sup>+</sup>-Naiven- und CD4<sup>+</sup>-Memory-Zellen, sowie die erhöhte Perforinproduktion der CD8<sup>+</sup>-Memory-Zellen in der Patientengruppe könnte auf eine potentiell pathologische Funktion dieser Zellpopulationen hinweisen, da sie laut Mahnke et al. normalerweise keine oder nur geringe zytotoxische Funktionen inne haben [94].

Die Zellpopulation der CD4<sup>+</sup>-zytotoxischen Lymphozyten (CTLs), welche sich aus unterschiedlichen CD4<sup>+</sup>-Subpopulationen entwickeln kann und als Abwehr gegen viraler Erreger fungieren soll [98], wurde auch in Synovialanalysen entzündeter Gelenke bei rheumatoider Arthritis nachgewiesen. Es wird angenommen, dass die CD4<sup>+</sup>-CTLs hier über Interaktion mit neutrophilen extrazellulären Netzen und über die Induktion weiterer proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 oder TNF $\alpha$  zur lokalen Inflammation beitragen [99].

Beim Vergleich der JIA-Gruppe mit den EAA-Patienten zeigte sich eine signifikant gesteigerte Produktion zytotoxischer Zytokine der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Effektor- und TEMRA-Zellen in der EAA-Population. Aggarwal et al. schildern ein tendenziell schlechteres Outcome bei EAA-Patienten im Vergleich zu anderen Subpopulationen sowie einen großen Einfluss u.a. auch des angeborenen Immunsystems [47]. Auch vor diesem Hintergrund ist ein vermehrter



proinflammatorischer Einfluss von CTLs in Bezug auf Krankheitsverlauf und -schwere zu diskutieren.

Insbesondere bei der Produktion zytotoxischer Zytokine sollten Unterschiede in der initialen Therapie beachtet werden. Die beiden EAA-Patienten wurden mit Etanercept behandelt, einer davon zusätzlich mit Sulfasalazin. Viele Patienten der JIA-Gruppe erhielten ebenfalls TNF $\alpha$ -Blocker, weshalb hierdurch kein relevanter Einfluss auf die unterschiedlichen Ergebnisse anzunehmen ist. Andererseits ist eine Inhibition der Zytotoxizität bei NK-Zellen durch Sulfasalazin bekannt [100]. Inwiefern diese auch bei T-Zellpopulationen vorliegt, ist noch nicht hinreichend untersucht. Jedoch erscheint vor diesem Zusammenhang eine erhöhte zytotoxische Aktivität der T-Zellen in der EAA-Gruppe nicht durch die medikamentöse Vortherapie erklärbar.

#### 5.1.2.2 *Einfluss der unspezifischen Stimulation auf die Ergebnisse*

Insgesamt gesehen war die Zytokinproduktion nach Stimulation mit Ionomycin und PMA in allen Bereichen deutlich erhöht, was nicht verwunderlich erscheint, da diese Stimulation die Zellen bekanntlich über Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in die Zelle und Aktivierung der Proteinkinase C zur Zytokinproduktion anregt [87].

Ohne Stimulation war die Granzym B-Produktion der CD4<sup>+</sup>-TEMRA-Zellen in den Patienten im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht, mit Stimulation jedoch relativ erniedrigt. Hier spiegelt die Granzym B-Produktion ohne Stimulation eher den erwarteten Zustand wider, da bei den TEMRAs eine vermehrte Zytokinproduktion zu erwarten ist [94].

Ein diverser Einfluss der PMA/Ionomycin-Stimulation auf unterschiedliche Zytokine wurde beschrieben [101, 102]. Der Einfluss der unspezifischen Stimulation ändert laut unseren Ergebnissen jedoch nicht grundsätzlich die Ausprägung der Zytotoxizität der Zellen. Vielmehr zeigten sich die Unterschiede zwischen den Gruppen ohne Stimulation z.T. deutlicher als mit Stimulation. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass sich die Stimulation mit PMA/Ionomycin in den Probandengruppen unterschiedlich auswirkt, beispielsweise durch Einfluss

von Biologika über diverse Signalwege in der Patientengruppe, so wirken z.B. TNF-Blocker auf andere Proteinkinasen ein [103].

Insgesamt ist gemäß unserem Vergleich der Ergebnisse zwischen stimuliertem und unstimuliertem Ansatz kein signifikanter Unterschied der Zytotoxizitätsaspekte der peripheren T-Zellen zu erwarten.

### **5.1.3 Unterschiede der Th1-/Th17-Verteilung**

Die IL-17-Produktion in den CD4<sup>+</sup>-Zellen war in der Patientengruppe signifikant erhöht. Jedoch zeigte sich die IL-17-Produktion der spezifischen Th17-Subpopulationen (CCR6<sup>+</sup>-, CD161<sup>+</sup>- und CCR6<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>- CD4<sup>+</sup>-T-Zellen) in JIA-Proben nicht signifikant erhöht. Analog zu unseren Ergebnissen fanden mehrere Studien einen erhöhten IL-17-Spiegel im Serum von JIA-Patienten, welcher auf eine vermehrte zelluläre Produktion rückschließen lässt. Teils wurden diese erhöhten Spiegel zusätzlich mit einer erhöhten Anzahl an Th17-Zell korreliert [69, 104].

Der IL-17-Spiegel in den EAA-Proben war verglichen mit der JIA-Gruppe sowohl in den CD4<sup>+</sup>- als auch den CD8<sup>+</sup>-Zellen erhöht. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Agarwal et al., die eine vermehrte IL-17-Expression in der Synovialflüssigkeit u.a. in dem Subtyp der EAA festgestellt hatten [55]. Auch Mahendra et al. stellten analog in der Synovialflüssigkeit von EAA-Patienten eine Dominanz von IL-17 sowie vermehrte Th17-Zellen fest [105]. Die Th17-Subpopulationen zeigten sich bei uns in den EAA-Patienten jedoch relativ erniedrigt, bei hingegen vermehrter IL-17-Expression in den einzelnen Subpopulationen. Dementsprechend liegt eine besonders starke IL-17-Produktion pro Th17-phänotypischer Zelle vor, was einer erhöhten IL-17-bedingten Pathogenität der Th17-Zellen in EAA-Patienten entsprechen könnte. Eine IL-17-Blockade durch Secukinumab zeigte sich besonders wirksam in Formen der Spondyloarthritis und Psoriasisarthritis [76]. Die von uns gemessenen erhöhten IL-17-Werte der juvenilen Spondylarthritis, der EAA, könnten eine Erklärung für den besseren Wirkmechanismus des Medikamentes in diesen Erkrankungsformen liefern.

Weiterhin zeigte sich ein signifikant höherer Anteil an phänotypischen Th17-Zellen in der Patientengruppe. Sowohl die CCR6<sup>+</sup>-, die CD161<sup>+</sup>- und die CCR6<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>-CD4<sup>+</sup>-Zellen waren erhöht. Auch die Arbeitsgruppe um Wu et al. fand eine Hochregulation an Th17-Zellen in Patienten, hier wurde jedoch lediglich IL-17 als Zellmarker verwendet [53]. Die CCR6<sup>+</sup>- und die CCR6<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>-Zellen der CD8<sup>+</sup>-Zellen waren ebenfalls signifikant erhöht.

CCR6<sup>+</sup>-Zellen wirken stark auf die Gelenkentzündung bei Arthritispatienten ein. Nicht nur über Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-17 oder TNF $\alpha$ , sondern auch über direkten Zellkontakt aktivieren sie die synovialen Fibroblasten und fördern somit das Entzündungsgeschehen [106].

Die IFN $\gamma$ -Produktion der CCR6<sup>+</sup>-Zellen in den Kontrollen war höher als in den JIA-Patienten, die IL-17-Produktion der Th17-CD4<sup>+</sup>-Zellsubpopulationen hingegen in den JIA-Patienten (nicht-signifikant) höher als in den Kontrollen. V.a. die Expression von IFN $\gamma$  in den phänotypisch als Th17-Zellen klassifizierten CD4<sup>+</sup>-Zellen könnte eine Plastizität hin zum Th17/Th1-Phänotyp aufzeigen. Dieser Subtyp wird als äußerst pathologisch angesehen [106]. Cosmi et al. untersuchten ebenfalls den Th1-like Th17-Phänotyp in JIA-Patienten und fanden in den gesunden Kontrollen einen leicht höheren Anteil IFN $\gamma$ -produzierender CD161<sup>+</sup>-Zellen. In der untersuchten Synovialflüssigkeit der JIA-Patienten zeigte sich die IFN $\gamma$ -Produktion der CD161<sup>+</sup>-Th17-Zellen jedoch um ein vielfaches höher als im Blut der Kontrollen [107]. Da wir in dieser Arbeit nur die Zellen des peripheren Blutes von JIA-Patienten untersucht haben, kann es sein, dass eine Untersuchung der Synovialzellen deutlich erhöhte Mengen an Th17/Th1-Zellen in JIA-Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen ergeben hätte. Weiterhin könnten die erniedrigten IFN $\gamma$ <sup>+</sup>-Anteile an den CCR6<sup>+</sup>- bzw. CD161<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen in der JIA-Population auch auf eine Erschöpfung der Zellen im Rahmen der in vitro Stimulation zurückzuführen sein. Die intrazelluläre Zytokinproduktion nach der unspezifischen Stimulation lässt jedoch keine 1:1 Rückschlüsse auf die in vivo Zytokinfreisetzung oder Serumkonzentrationen der Zytokine zu.

#### 5.1.4 Unterschiede im Phänotyp der regulatorischen T-Zellen

Die Treg-Charakteristika der CD4<sup>+</sup>-Zellen waren analog zu den Ergebnissen der Treg-Charakterisierung, wenn auch nicht signifikant, in der Patientengruppe erhöht. Die IL-10-Produktion in den Tregs der JIA-Kohorte war signifikant höher.

Die Studienlage zur Anzahl der Tregs im Blut von JIA-Patienten ist umstritten. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen stellten Wu et al. zwar eine leichte Erhöhung an Tregs fest, jedoch ohne signifikanten Unterschied [53], Sznurkowska et al. eine Erhöhung [108], Olivito et al. eine Erniedrigung [109]. Lina et al. maßen eine erhöhte Th1 und Th17-Zellzahl bei gleichzeitig erniedrigter Treg-Zahl im Blut von RA-Patienten [110]. Zu beachten ist, dass nicht nur die JIA-Patienten in Krankheitssubtyp und –aktivität unterschiedlich waren, sondern auch die Definition der Tregs und sich die Studien daher nicht komplett 1:1 vergleichen lassen.

In den CD8<sup>+</sup>-Zellen maßen wir einen signifikant erhöhten Anteil an IL-10-Produktion in der Patientengruppe. IL-10 produzierende CD8<sup>+</sup>-T-Zellen sind auch als CD8<sup>+</sup>Tregs bekannt. Die Funktion dieser Zellen beruht auf einer Suppression anderer CD8<sup>+</sup>-Zellen, aber auch CD4<sup>+</sup>-Zellen und APCs mithilfe des von ihnen produzierten IL-10 und TGFβ [111, 112]. Die CD8<sup>+</sup>Tregs haben keine einheitliche Oberflächenmarker-Definition, sie werden häufig durch CD28<sup>-</sup>, aber auch durch CD25<sup>+</sup> oder CD122<sup>+</sup> charakterisiert. Weiterhin können sie FoxP3 exprimieren. In einigen Immunerkrankungen wurde eine erniedrigte Zahl an CD8<sup>+</sup>Tregs festgestellt, eine Zunahme ihrer Anzahl spiegelte dann eine erfolgreiche Kontrolle der Erkrankung wider [111]. Die in unserer Arbeit außerdem gemessene signifikant erhöhte Anzahl an CCR6<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen könnte auf eine möglicherweise vermehrte Plastizität dieser CD8<sup>+</sup>Tregs in der Patientengruppe hinweisen. Über die Funktionalität der CD8<sup>+</sup>Tregs lässt sich keine Aussage treffen, da sie in dieser Arbeit nicht näher beleuchtet wurden.

Die zum Großteil erhöhte Anzahl an Tregs in der JIA-Gruppe verglichen mit der EAA-Gruppe korreliert mit der Studie von Szymanska-Kaluza et al., die eine höhere Treg-Anzahl im peripheren Blut in der milden Oligoarthritis verglichen mit schwerwiegenderen Formen wie Polyarthritis oder sJIA fanden [69]. Die höhere

Treg-Anzahl könnte einen Einfluss auf den zukünftigen Verlauf einer JIA besitzen. Die Zunahme an Tregs in Remissionsphasen oder nach Stammzelltransplantation bei JIA-Patienten fanden Kleer et al., zusammengefasst in Prakken et al. [42, 73, 113]. Pesenacker et al. erörterten ferner, dass Kinder mit späterer persistierenden Oligoarthritis bereits zu Krankheitsbeginn höhere Treg-Spiegel in der Synovialflüssigkeit besitzen als Kinder mit einer zukünftigen extended Oligoarthritis. Auch beschrieben die Autoren eine höhere Treg-Anzahl im Blut von asymptomatischen sJIA-Patienten als von Patienten mit aktiver sJIA oder gesunden Kontrollen [72]. Ferner zeigten neueste Studienergebnisse in RA-Patienten eine mögliche Biomarker-Funktion der Tregs in Patienten, die sich in einer Drug-Free-Remission (sprich in einer Remission ohne begleitende DMARD-Therapie) befinden: Patienten mit erhöhter Treg-Anzahl nach Beendigung der DMARD-Therapie blieben eher in Remission, als Patienten, die eine erniedrigte Treg-Anzahl zum Zeitpunkt der Beendigung aufwiesen [114]. Es lässt sich in unserer Studie keine Aussage über den Zusammenhang mit dem weiteren Krankheitsverlauf treffen, da lediglich ein Zeitpunkt untersucht wurde. Jedoch bestätigen die genannten Erkenntnisse anderer Arbeitsgruppen den essenziellen Aspekt der Tregs hinsichtlich der Erfassung der Krankheitsaktivität sowie möglicherweise auch des Monitorings des Krankheitsverlaufs. Unsere Ergebnisse könnten daher ebenfalls auf einen milderen Verlauf der Erkrankung der JIA-Patienten verglichen mit den EAA-Patienten hindeuten. Interessanterweise zeigte sich die IL-10-Produktion in den EAA-Proben trotz niedrigerer Treg-Anzahl vergleichsweise leicht erhöht. Dies könnte als ggf. kompensatorischer Mechanismus mit stärkerer Einzelzellaktivierung zu verstehen sein.

Die zeitgleiche CCR6- und IL10-Expression bzw. CCR6- und FoxP3-Expression in den CD4<sup>+</sup>- bzw. den CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wurde in unseren Versuchen in der Patientengruppe deutlich häufiger gemessen als in der Kontrollgruppe. Da CCR6 ein wichtiges Molekül für die Migrationsfähigkeit der Zellen in entzündete Gebiete ist, könnten diese Ergebnisse laut Campbell et al. auf eine Spezialisierung der Tregs auf spezifische T-Zellpopulationen und damit verbundene Immunreaktionen, in diesem Fall auf eine Spezialisierung auf Th17-vermittelte

Entzündungen hinweisen [18]. Gleichzeitig wird CCR6 (sowie auch ROR $\gamma$ t und CD161) als Voraussetzung für eine Plastizität der Tregs hin zu Th17-like Tregs gesehen [29]. Die von uns festgestellte Erhöhung der sowohl für CCR6-, als auch für Treg-Marker positiven T-Zellen in der Patientenkohorte kann daher entweder eine Anpassung peripherer Zellen auf das vorherrschende inflammatorische Milieu sein oder Ausdruck einer vorliegenden eher pathogenen Treg-Zelllinie mit Potential zum proinflammatorischen Th17-like-Phänotyp [18, 29].

### **5.1.5 Unterschiede der Treg/Th17-Balance**

Während die Th17-Oberflächenmoleküle CCR6 und CD161 in der Patientengruppe signifikant höher exprimiert waren als in der Kontrollgruppe (vgl. Kapitel 5.1.3), so war die Expression des Th17-typischen Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t in den CD4<sup>+</sup>-Zellen der Patienten signifikant niedriger. Auch die ROR $\gamma$ t-Expression in den CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Patienten-T-Zellen war erniedrigt. Die erniedrigten ROR $\gamma$ t-Spiegel in Patienten könnten bei gleichzeitig erhöhten FoxP3-Spiegeln die bereits von Olivito et al. festgestellten reziproken Verhältnisse dieser beiden Transkriptionsfaktoren widerspiegeln [109]. In deren Studie wurde in der Synovialflüssigkeit von JIA-Patienten eine inverse Korrelation zwischen FoxP3- und RORC2-mRNA gemessen. Eine mögliche Erklärung dieser Verhältnisse liegt in der suppressiven Eigenschaft von FoxP3 auf andere Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise ROR $\gamma$ t [22].

Interessanterweise war das von ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen produzierte IL-17 in den Patienten signifikant erhöht. Ähnlich verhielt es sich mit dem von FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen produzierten IL-17. Letzterer Befund stellt sich analog zur ebenfalls erhöhten IL-17-Produktion der FoxP3<sup>+</sup>Tregs in der Patientenpopulation in der Treg-Charakterisierung dar.

Stadhousers et al. beschreiben die Wichtigkeit epigenetischer Veränderungen in der Th17-Zellentwicklung. Während Th1- und Naive-CD4<sup>+</sup>-Zellen einen stark methylierten Promoter und zum Großteil inaktiviertes IL-17A besitzen, vollführt sich in der Differenzierung zur Th17-Zelle eine epigenetische Veränderung über Promoter-Demethylierung und –Aktivierung, sowie über Installation

genregulatorischer Elemente. In Mäusen beispielsweise bewirken eine TCR-Stimulation, sowie die Transkriptionsfaktoren BATF und IRF4 eine Veränderung der Chromatinlandschaft, die eine ROR $\gamma$ t-Bindung und IL-17A-Aktivierung erst möglich macht [24]. Weiterhin wird die IL-17-Expression durch die nichtcodierende Sequenz CNS2 beeinflusst, die in starker Interaktion mit ROR $\gamma$ t die Aktivierung der Transkription der IL-17-Genloci bestimmt [115]. Ein gehäuftes Auftreten von Polymorphismen in genregulierenden Elementen in Autoimmunerkrankungen, u.a. JIA, wurde in Th17-Enhancern gefunden. Diese Polymorphismen beeinflussen auf unterschiedliche Weise Bindungsmotive von Transkriptionsfaktoren und somit auch die Genexpression und könnten dadurch eine feine, aber entscheidende Änderung der Immunantwort hervorrufen [26].

Vor dem Hintergrund dieser Studienlage könnte eine mögliche Erklärung der erniedrigten ROR $\gamma$ t- bei gleichzeitig erhöhter IL-17-Produktion in der Patientengruppe sein, dass entweder die genetischen Polymorphismen oder die in der Th17-Zelldifferenzierung erfolgte Veränderung der Chromatinlandschaft zu einer verstärkten IL-17-Expression führt, die bereits bei vergleichsweise geringer ROR $\gamma$ t-Expression erfolgt.

Weiterhin könnte die IL-17-Produktion auf Zellen vom Th17-like-Phänotyp zurückzuführen sein, die eine Hochregulation von ROR $\gamma$ t zusätzlich zu FoxP3 oder T-bet besitzen, wobei diese ROR $\gamma$ t-Hochregulation jedoch ggf. nicht so stark ausgeprägt ist. Zhao et al. fanden in ihrer Studie zu vorher als CD161<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> klassifizierten Th17-Zellen bei Sjögren-Patienten einen größeren ROR $\gamma$ t-Anteil, der außerdem mit der Krankheitsaktivität korrelierte. Sie vermuteten einen Zusammenhang zwischen Th1-, inflammatorischen Tregs oder ex-Th17-Zellen und ROR $\gamma$ t-Th17-Zellen [116]. Diese Vermutungen decken sich auch mit den von uns festgestellten hohen Raten an IL-17<sup>+</sup>- oder CCR6<sup>+</sup>-Zellen mit gleichzeitiger FoxP3-Expression in den JIA-Proben. Interessanterweise beschreiben Henderson et al. in der sJIA im akuten Schub zunächst das Auftreten von IL-17 produzierenden FoxP3<sup>+</sup>-Tregs, welche die entsprechende Treg-typische Demethylierung in der CNS2-Region aufweisen. Im chronischen Verlauf hingegen liegen vermehrt T-Effektor-Zellen mit einer hochregulierten RORC-Genexpression vor [117]. Komatsu et al. beschrieben eine erhöhte

Osteoklastigenität von sog. „exFoxP3Th17“-Zellen im kollageninduzierte-Arthritis-Mausmodell. Die „exFoxP3Th17“-Zellen entstehen über IL-17<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Tregs aus ehemals CD25<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup>Tregs, die dazu neigen in Entzündungsgebieten ihre FoxP3-Expression zu verlieren. Diese Zellen sind durch vermehrte RANKL-, CCR6- und ROR-Expression sowie niedriger IL-10-Expression noch pathogener als übliche Th17-Zellen [118]. Eine erhöhte Osteoklastigenität der von uns gemessenen IL-17<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Tregs im arthritischen Milieu könnte einen Beitrag zur Pathogenese der JIA leisten. Plastische IL-17-produzierende Zellen könnten, insbesondere im akuten Schub, in Autoimmunerkrankungen daher eine vielleicht sogar größere Rolle spielen als klassische Th17-Zellen.

Im Vergleich der EAA-Proben mit den übrigen JIA-Proben zeigte sich eine vermehrte IL-17-Produktion in den FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen und den FoxP3<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen. Analog ist auch der IL-17-Anteil der RORγt<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen erhöht. Bei o.g. Studienlage könnte dies auf eine vermehrte Pathogenität der plastischen und üblichen Th17-Zellen hindeuten und damit Hinweise auf den üblicherweise schwerer wiegenden Krankheitsverlauf der EAA geben.

## **5.2 Interpretation des Einflusses der Stimuli auf den Phänotyp der Tregs**

Bei der Kultivierung der Tregs mit den jeweiligen Stimuli zeigte sich die FoxP3-Expression der CD4<sup>+</sup>-Zellen im Th17-Ansatz sowohl in der Patienten- (signifikant), als auch in der Kontrollgruppe (nicht-signifikant) am höchsten. Auch der Anteil der CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>-Tregs an den CD4<sup>+</sup>- bzw. an den FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen war in dem proinflammatorischen Th17-Milieu am größten (nicht-signifikant). Zusätzlich ließ sich in der Patientengruppe eine im anti-IL-17-Ansatz signifikant erhöhte FoxP3-Expression der CD4<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zum unstimulierten Ansatz feststellen sowie eine hingegen signifikant verminderte Expression im Medikamenten-Ansatz verglichen mit dem Th17-Milieu.

Im Gegensatz zur vermehrten Expression von Treg-Charakteristika im Th17-Ansatz ließ sich der jeweils niedrigste Mittelwert an IL-17-Produktion in den



FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen und den FoxP3<sup>+</sup>-Tregs im Th17-Milieu in der Patientengruppe feststellen. In den gesunden Kontrollen ließ sich diese Tendenz nicht abbilden.

Am wahrscheinlichsten erscheint als Erklärung der höheren Treg-Marker die unten näher ausgeführte Zellaktivierung, die im Th17-Milieu am stärksten zu sein scheint und eine CD25- und FoxP3-Mehrexpression zur Folge haben kann [6, 23]. Diese Ergebnisse widersprechen jedoch dem Ansatz von Campbell et al., die in ihrem Review einen FoxP3-Verlust bei Anwesenheit von IL-6 postulierten [18]. Rubtsov et al. hingegen sprechen auch in stark inflammatorischem Milieu von einer stabilen FoxP3-Expression der Tregs [119]. Auch Olivito et al. fanden erhöhte FoxP3-Spiegel pro einzelner Treg in arthritischem Milieu [109]. Bending et al., auch beschrieben in der Übersichtsarbeit von Copland et al., konnten eine vermehrte FoxP3-Transkription durch Tregs in entzündeten Gebieten messen [120, 121]. Ferner wurde eine vermehrte FoxP3-Expression unter TGFβ (welches Teil unseres Th17-Milieus war) Einfluss in der iTreg Entwicklung beschrieben [6]. Komatsu et al. sahen einen FoxP3-Verlust in arthritischem Milieu in Th17-like Tregs in ehemals CD25<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup>Tregs [118]. Die von uns durchgeführte Zellisolation von CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen vor Beginn der Kultur könnte eine Selektion von eher CD25<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen geführt haben und damit einen ausbleibenden FoxP3-Verlust erklären.

Interessanterweise führte der Kulturansatz mit dem Laborantikörper anti-IL-17A im Patientenkollektiv ebenfalls zu einer vermehrten FoxP3-Expression, wohingegen sich die Expression in der Kultur mit dem spezifischen klinischen IL-17A-Inhibitor Secukinumab als stabil zeigte. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür wäre, dass diese im Vergleich zum als interne Validierungskontrolle verwendeten Laborantikörper vermutlich noch spezifischere Blockierung und Unterbindung der Rezeptorinteraktion zu einer Adjustierung der Treg-Aktivierung auf das Niveau der Zellaktivierung der gesunden Kontrollen führt.

Die niedrige IL-17-Produktion durch die isolierten Tregs im Th17-Milieu in der Patientengruppe steht im Widerspruch zur IL-17-Zunahme, die man in dem Th17-stimulierenden Milieu eigentlich erwarten würde. IL-1β und IL-6 fördern die

Plastizität der Tregs hin zu einem Th17-like Treg-Typ [29]. Koenen et al. schreiben TGF $\beta$  keinen Einfluss auf die Produktion von IL-17 durch Tregs zu [122]. Auch Beriou et al. beschrieben eine Induktion der IL-17-Sekretion in diesen Zellen unter IL-1 $\beta$ - und IL-6-Bedingungen, während die IL-17-Sekretion unter TGF $\beta$ -Einfluss sank [35]. Möglicherweise war der TGF $\beta$ -Einfluss auf die Tregs in unserem Versuchsaufbau dominanter als der IL-1 $\beta$  und IL-6-Einfluss. Die inverse Korrelation von IL-17- und FoxP3-Expression in den Tregs ähnelt gleichzeitig den Ergebnissen einer Studie von Nistala et al., bei der CD4<sup>+</sup>-Zellen der Synovialflüssigkeit von JIA-Patienten untersucht wurden und eine reziproke Beziehung zwischen IL-17<sup>+</sup>-Zellen und FoxP3<sup>+</sup>-Tregs festgestellt wurde [54].

## **5.2.1 Interpretation des Vergleichs der Stimulieinflüsse auf die Probengruppen**

### *5.2.1.1 Vergleich der Treg-Marker*

Prinzipiell konnten in den Patientenproben im Vergleich mit den Kontrollproben eine erhöhte Anzahl der FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen und der CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> (FoxP3<sup>+</sup>)CD4<sup>+</sup>-Zellen beobachtet werden. Besonders signifikant war der Unterschied zwischen den FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen im Th17-Ansatz und im anti-IL-17-Ansatz. Nach Kultur mit Secukinumab war der Unterschied als nicht mehr signifikant zu verzeichnen.

Die vermehrte Treg-Anzahl bei Patienten könnte verschiedene Ursachen haben. Es könnten bereits zu Beginn der Kultur erhöhte Anzahlen an CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>-Tregs vorgelegen haben oder die Treg-Marker der Patienten erwiesen sich unabhängig von den Stimuli als stabiler für die Kultur. Sowohl Reinheitsgrad (Patienten: 75,18 $\pm$ 7,63 %, Kontrollen: 75,22 $\pm$ 5,42 %) als auch die verwendete Treg-Anzahl (Patienten: 133333 $\pm$ 77309 Tregs, Kontrollen: 234167 $\pm$ 118550 Tregs) war nach der Isolierung jedoch ohne signifikanten Unterschied ( $p > 0,1$ ). Dies lässt folgern, dass die vermehrte Treg-Anzahl auf Prozesse während der Kultur zurückzuführen ist, die entweder auf einer Proliferation der Tregs der Patienten, instabilen Treg-Marker der Kontrollen oder einer vermehrten Treg-Marker-Expression der Patienten basieren.

Über die FoxP3-Expression vor der Kultur lässt sich keine direkte Aussage treffen. Drei Möglichkeiten erscheinen zur Erklärung der vermehrten FoxP3-Expression in Patienten plausibel:

1) Es könnte sein, dass die isolierten Tregs der Patienten von Anfang an eine stärkere Expression besaßen. Dies würde den durchweg höheren FoxP3-Anteil der Patientenzellen bei allen Stimuli erklären. Die Annahme deckt sich mit den Ergebnissen der PBMC-Charakterisierung, die einen (nicht signifikant) erhöhten Anteil an FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- und CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen in der Patientengruppe verglichen mit der Kontrollgruppe ergab. Einige Studien untersuchten bereits die Anzahl der FoxP3<sup>+</sup>Tregs im peripheren Blut von JIA-Patienten mit unterschiedlichen Ergebnissen. Während beispielsweise die Arbeitsgruppe um Sznurkowska erhöhte FoxP3<sup>+</sup>Tregs im Blut neu diagnostizierter JIA-Patienten fand [108], maßen Olivito et al. erniedrigte FoxP3<sup>+</sup>-Zellzahlen im Blut der JIA-Patienten (nicht neu diagnostiziert) [109]. Diese These erklärt allerdings nicht die verstärkte Zunahme der FoxP3-Expression im anti-IL-17- und Th17-Milieu.

2) Alternativ könnte sich eine zunächst ähnliche FoxP3-Expression der CD4<sup>+</sup>-Zellen und der Tregs dahingehend entwickelt haben, dass die bei Patienten möglicherweise stabilere FoxP3<sup>+</sup>-Expression persistiert und die Zellen der Kontrollgruppe einen Teil ihrer FoxP3-Positivität über den Kulturzeitraum verloren haben. Eine stabilere FoxP3-Expression wird durch demethyliertes CNS2 hervorgerufen, induzierte Tregs haben eine instabilere FoxP3-Expression, da sie nur graduell die spezifischen Demethylierungsmuster erlangen [16]. Weiterhin behalten CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> selbst unter arthritischen Bedingungen zu über 96 % ihre FoxP3-Expression [118]. Li et al. postulierten außerdem, dass die Zellzyklusprogression und Zellproliferation einen Einfluss auf die Stabilität der FoxP3-Expression haben. Aktivierung von Stat6 und Stat3 (über IL-4 und IL-6) und die darauf folgende Zellproliferation wird mit instabilem FoxP3 assoziiert [123]. Auf Grundlage dieser Hypothesen wäre eine mögliche Erklärung für die stärkere FoxP3-Expression der Patientenzellen, dass die Tregs der Kontrollen entweder zu einem größeren Teil eine induzierte FoxP3-Expression in iTregs besitzen oder dass die Tregs der Kontrollen stärker proliferieren, beides

verbunden mit einem Verlust der FoxP3-Expression während des Kulturzeitraums in den Kontrollen. Letzte Vermutung wäre kongruent mit der per se höheren Proliferationsrate der PBMCs der gesunden Kontrollen in den Suppressions-Assays, inkongruent jedoch mit der v.a. im Th17-Cocktail erniedrigten Gesamtproliferation. Auf der anderen Seite muss als eine mögliche Ursache der stabileren FoxP3-Expression in den Patienten-Tregs der transkriptionale, epigenetische und posttranslationale Einfluss bedacht werden, der durch Vitamin-Substitutionen verursacht wird. So fördert eine Vitamin D Substitution bzw. eine Vitamin C Substitution jeweils die FoxP3-Expression respektive die CNS2-Demethylierung [124]. 5 Patienten hatten eine Vitamin D Substitution angegeben. Da Vitamin-Präparate oft nicht verschreibungspflichtig sind, ist nicht erfasst, wie viele Kontrollen eine entsprechende Substitution/Ergänzung durchführten.

3) Eine weitere Erklärung für die erhöhte FoxP3-Expression wäre, dass die Zellen der Patientengruppe während der Kultur neues FoxP3 exprimiert haben. Die Treg-Marker CD25 und FoxP3 sind Marker einer starken Zellaktivierung und ihre Expression wird bei T-Zellaktivierung zumindest temporär hochreguliert [6, 22]. Laut Bending et al. sind theoretisch in einer CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>-T-Zellpopulation sowohl aktivierte T-Effektor-Zellen, als auch Tregs enthalten [125]. Es besteht die Möglichkeit, dass die für die Treg-Charakterisierung verwendeten T-Zellen der Patienten durch die Stimuli vergleichsweise stärker aktiviert wurden als die der Kontrollen. Diese vermehrte Aktivierung fand dann demnach vor allem im anti-IL-17- und Th17-Milieu statt. Ein proinflammatorisches, arthritiden-ähnliches Milieu (wie das hier erzeugte Th17-Milieu) hat die Fähigkeit Zellen zu aktivieren, was nicht zwangsweise mit einer verstärkten Proliferation einhergehen muss [126] und damit nicht im Gegensatz zu den Proliferationsraten im Suppressions-Assay steht. Anti-IL-17A fängt als Zytokinantikörper das i.d.R. proinflammatorische IL-17 ein und könnte so das Zytokininmilieu in diverse Richtungen verschieben, was ggf. auch eine stärkere Aktivierung der Zellen bewirken könnte. Interessanterweise führte eine sehr spezifische Inhibierung von IL-17A im Medikamentenansatz und die damit vollständige Unterbindung der Rezeptorinteraktion anscheinend zu einer „stabileren“ FoxP3-Expression in der

Patientenkohorte im Sinne von weniger starker Zellaktivierung und damit Adjustierung der Expression auf annäherndes Niveau der Kontrollgruppe. Im Th17-Milieu besteht außerdem die Möglichkeit, dass die T-Zellen der Patienten besonders stark auf das TGF $\beta$  des Cocktails ansprachen, was eine FoxP3-Induktion bewirken kann (allerdings in Gegenwart von IL-6 eher für eine Ausprägung des Th17-like Treg-Phänotyps mit gleichzeitiger ROR $\gamma$ t-Expression) (vgl. Abbildung 5) [6].

In der Gesamtschau betrachtet erscheint die dritte These am wahrscheinlichsten. Sie erklärt die höchsten FoxP3- und CD25-Werte im Th17-Ansatz und in der Patientengruppe allgemein und widerspricht nicht den generell erniedrigten Proliferationsraten der Patientengruppe, sowie der stark verminderten Proliferation in Patienten- und Kontrollgruppe v.a. im Th17-Milieu, da eine erhöhte IL-2-Rezeptordichte (CD25) der T-Zellen nicht automatisch eine vermehrte Proliferation bedeutet. Die Proliferation würde vermutlich erst bei hohem IL-2-Spiegel erfolgen, welches in unserem Versuchsaufbau jedoch nicht von außen zugeführt wurde.

#### 5.2.1.2 *Vergleich der proinflammatorischen Zytokine in Tregs*

Die IL-17<sup>+</sup>- und die IL-17<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>-FoxP3<sup>+</sup>-Tregs waren in der Patientenkohorte stets vermehrt (nicht signifikant). Eine Erhöhung von IL-17 im Blut von JIA-Patienten fanden auch Szymanska-Kaluza et al., Jager et al. und Agarwal et al. bei einigen Subpopulationen [55, 69, 104]. Jager et al. beschrieben ebenfalls eine (nicht signifikante) Erhöhung von IFN $\gamma$  im Blut von JIA-Patienten [104].

Da sowohl IL-17 als auch IFN $\gamma$  als vorrangig proinflammatorische Zytokine wirken, ist ihre leicht vermehrte Expression in den Tregs der Patienten kongruent mit der bereits in einigen Arbeiten vermuteten erhöhten Plastizität der Tregs hin zu Effektor-Treg-Zellen mit u.a. IL-17 und IFN $\gamma$ -Produktion in der Pathogenese der Arthritis [30]. Insbesondere in der oligo- und polyartikulären Form der JIA wird eine Dysbalance zwischen Treg und Th1/Th17-Zellen als zentraler Punkt der Pathogenese angesehen, das proinflammatorische Zytokinmilieu wird prädominant durch TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  und IL-17 gebildet [51].

In der Synovialflüssigkeit von JIA-Patienten wurden IL-17<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>-konventionelle-T-Zellen ebenfalls beschrieben [107, 127]. Ob die leicht vermehrten effector-like-Tregs in den JIA-Patienten an der Pathogenese selbst mitwirken oder als eine Reaktion auf bereits vorhandene Th1/Th17-Zellen zu sehen sind, bleibt unklar.

Die Plastizität der Tregs hin zu Effektor-Phänotypen ist bei einer Vielzahl autoimmuner Erkrankungen beobachtet worden. Dominguez-Villar et al. beschreiben die Entwicklung von Th-spezifischen Tregs in inflammatorischem Milieu, was als Immunmechanismus beispielsweise in Infektionen dient. Hingegen wird eine abnormale Plastizität in Autoimmunerkrankungen angenommen, hier fördert das inflammatorische Milieu die inflammatorische Zytokinproduktion durch Tregs [128]. In einer vergleichenden Untersuchung des Th1-Phänotyps auf Tregs in erkrankten Patienten mit Multiple Sklerose sowie gesunden Kontrollen zeigte sich eine erhöhte IFN $\gamma$ -Sekretion in den Patienten bei zeitgleicher Dysfunktionalität der plastischen Tregs. Die plastischen Tregs der gesunde Kontrollen waren weniger anfällig für eine Produktion von proinflammatorischen Zytokinen in inflammatorischem Milieu [129]. Eine ebenfalls ausgeprägtere Wirkung durch inflammatorisches Milieu mit konsekutiver Plastizität hin zu Th17-like Tregs, die vermehrt proinflammatorisches IL-17 produzieren, wurde analog bei Psoriasispatienten beschrieben [130]. Eine vermehrte IL-17 oder IFN $\gamma$  in proinflammatorischem Zytokinmilieu wurde in unserem Versuch jedoch bei keiner der beiden Gruppen festgestellt.

Zu beachten ist, dass durch PMA/Ionomycin-Stimulation eine vermehrte IFN $\gamma$ -Produktion in Tregs festgestellt wurde [29]. Dieser Einfluss sollte sich jedoch auf beide Studiengruppen gleichmäßig auswirken und erklärt daher nicht die tendenziell höhere IL-17<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>-Expression der FoxP3<sup>+</sup>-Tregs in der Patientengruppe.

Zu erwähnen ist ferner, dass ein Patient besonders hohe IL-17 und IFN $\gamma$ -Werte in den Tregs und FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen aufwies. Dieser Patient mit extended Oligoarthritis war bei Blutentnahme deutlich älter als die anderen Probanden der JIA-Gruppe (27 Jahre) und besaß die längste Krankheitsdauer (24 Jahre), was

möglicherweise zu einer vermehrten oder leichteren proinflammatorischen Aktivierung beitragen kann. Weiterhin war der Patient zum Blutentnahmezeitpunkt leicht leukopen. Dieser Aspekt spiegelte sich auch nach der 5-tägigen Kultivierungszeit wider, denn die Anzahl der lebendigen Tregs war vergleichsweise gering. Ein Unterschied von wenigen Zellen je nach Färbung führt daher zu großen Prozentzahlunterschieden. Diese beiden Umstände können eine Erklärung für die besonders hohen IL-17- und IFN $\gamma$ -Werte des Patienten darstellen.

### **5.3 Interpretation des Einflusses der Stimuli auf Suppressionsfähigkeit der Tregs**

Um den Einfluss von IL-17, IL-17-Inhibition und einem Th17-stimulierenden Milieu auf die Funktion der Tregs zu untersuchen, kultivierten wir die Tregs mit PBMCs unter jeweiligen Kulturbedingungen und analysierten sowohl Proliferationsverhalten der PBMCs als auch Suppressionsverhalten der Tregs. Es zeigte sich eine annähernd gleiche PBMC-Proliferation und Inhibition in den Ansätzen von IL-17, anti-IL-17 und Medikament verglichen mit der Positivkontrolle. Eine Ausnahme bildete die signifikant gesteigerte Proliferation der PBMCs in den gesunden Kontrollen im Medikamentenansatz. Eine signifikant verminderte PBMC-Proliferation zeigte sich hingegen in der Negativkontrolle in beiden Gruppen und zusätzlich im Th17-Cocktail der Kontrollgruppe, in der JIA-Gruppe war diese Minderung im Th17-Milieu nicht signifikant. Ferner proliferierten die PBMCs der Patienten im Th17-Kulturmilieu signifikant schlechter als die der gesunden Kontrollen. Die Suppressionsfähigkeit der Tregs war ebenfalls in der Negativkontrolle und im Th17-Milieu beider Gruppen signifikant vermindert.

Der Einfluss der Stimuli auf die Proliferationsrate war besonders in der Kontrollgruppe beobachtbar. Während eine durchschnittliche Minderung der Proliferation der PBMCs im Th17-Milieu auch in der Patientengruppe sichtbar war, so war die Minderung in der Kontrollgruppe signifikant. Eine mögliche Erklärung dieses Verhaltens läge darin, dass im Th17-Milieu eine vermehrte

Aktivierung der Zellen vorliegt, ohne eine zeitgleiche vermehrte Proliferation nach sich zu ziehen. Black et al. fanden in ihrer Studie zur Zellaktivierung in arthritischem Milieu erhöhte Spiegel an Zellaktivierungsmarkern, wobei sich der Großteil der Zellen in der G0/G1-Phase befand und damit eine niedrige Proliferation aufwies [126]. Der stärkere Einfluss der Stimuli auf die Zellen der Kontrollprobanden an sich ließe sich ggf. durch die therapienaiven Lymphozyten in dieser Gruppe erklären.

Gleichzeitig ist die Proliferation der Patienten-PBMCs generell, besonders aber im Th17-Ansatz signifikant niedriger als die der PBMCs gesunder Kontrollen. Mögliche Erklärungen hierfür liegen in einer generell niedrigeren Proliferationsrate der Patientenzellen beispielsweise durch immunsuppressive Therapie oder in einer stärkeren Sensibilität der Zellen für die immunsuppressiven Effekte von TGF $\beta$  im Th17-Cocktail. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die Patientenzellen durch den Th17-Cocktail noch stärker aktiviert wurden und damit die Proliferation sank. Dies würde sich auch mit den vermehrten Zellaktivierungsmarkern wie FoxP3 und CD25 der Tregs der Patienten im Th17-Milieu in der Treg-Charakterisierung decken (vgl. auch Erläuterung 3) in Kapitel 5.2.1.1).

Die signifikante Minderung der Inhibitionsfunktion der Tregs im Th17-stimulierenden Milieu lässt sich durch zwei mögliche Mechanismen erklären.

1) Zum einen könnte eine Dysfunktion der Tregs selbst vorliegen. Dies könnte mit einer instabilen FoxP3-Expression unter inflammatorischen Bedingungen oder einer Konversion der Tregs zu T-Effektor-Zellen zusammenhängen [6].

1a) Die FoxP3-Expression der CD4<sup>+</sup>-Zellen in der Treg-Charakterisierung zeigte im Th17-Milieu sowohl im Vergleich zum unstimulierten Ansatz als auch zur Positivkontrolle eine deutliche bis signifikante Erhöhung sowohl in der Patienten- als auch in der Kontrollkohorte. Es ist bekannt, dass auch Effektor-CD4<sup>+</sup>-T-Zellen bei Aktivierung FoxP3 temporär exprimieren, jedoch nicht suppressiv wirken können [131]. Auch die FoxP3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen waren in unserer Arbeit in dem proinflammatorischen Kulturmilieu am höchsten. Diese Ergebnisse widersprechen der bisherigen Studienlage, die einen FoxP3-Verlust unter IL-6-



Einfluss schildern [132, 133]. Interessanterweise beschrieb Zheng hierbei einen Einfluss von IL-6 lediglich auf Funktion und Phänotyp mit Verlust der Suppressionsfunktion von nTregs, während iTregs nicht anfällig für eine Plastizität durch das proinflammatorische Zytokin waren [133]. Diesem Ergebnis entgegen steht eine Untersuchung von McClymont et al., die eine erhöhte proinflammatorische Plastizität von iTregs mit noch vorhandener, jedoch reduzierter Suppressionsfunktion in inflammatorischem Milieu beschrieben [134].

TGF $\beta$  induziert in vitro bei naiven CD4<sup>+</sup>-Zellen eine FoxP3-Expression, die jedoch schnell verloren gehen kann [123]. Ggf. wirkte in dem von uns verwendeten Th17-Milieu das TGF $\beta$  zunächst verhältnismäßig stärker als die anderen proinflammatorischen Bestandteile und induzierte somit eine FoxP3-Expression. Die vorausgegangene Selektion der CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen als Tregs für unsere Treg-Charakterisierung unter Stimulieinfluss könnte bereits zu einer Vorselektion besonders stabiler Tregs geführt haben, die dazu tendieren, ihre FoxP3-Expression aufrecht zu erhalten [123]. Auch Rubtsov et al. fanden im Mausmodell äußerst stabile FoxP3<sup>+</sup>Tregs selbst unter (auto)inflammatorischen Bedingungen [119]. Der Vergleich der Suppressions-Assays mit den Ergebnissen der Treg-Charakterisierung lässt eine instabile FoxP3-Expression der Tregs als Ursache der verminderten Effektorzell-Inhibition folglich unwahrscheinlich erscheinen.

1b) Die Arbeitsgruppe um Xu fand eine Plastizität von aktivierten Tregs hin zu IL-17-produzierenden Th17-like Zellen in Anwesenheit von IL-6 [132]. Beriou et al. postulierten, dass Th17-like Tregs per se noch eine erhaltene Suppressionsfunktion besitzen, diese jedoch, während sie IL-17 produzieren, verlieren [34]. Das in dieser Arbeit verwendete Th17-Kulturmilieu mit IL-6 und IL-1 $\beta$  könnte aktivierte Tregs zu einer solchen IL-17-Produktion anregen [13, 34]. In der von uns durchgeführten Treg-Charakterisierung wurde auch die IL-17-Produktion der Tregs in den unterschiedlichen Kulturbedingungen betrachtet. Unsere Ergebnisse zeigten, dass keine signifikanten Unterschiede in der IL-17-Produktion zu verzeichnen waren. Lediglich eine Tendenz zur niedrigsten IL-17-Produktion im Th17-Milieu in der Patientengruppe war beobachtbar. Eine vermehrte IL-17-Produktion im Th17-Milieu ließ sich nicht darstellen: Unsere

Ergebnisse widersprechen somit der Studie von Beriou et al. und machen eine verstärkte Plastizität der Tregs hin zu effector-like Tregs unter Th17-stimulierenden Bedingungen als Grund der Suppressionsminderung unwahrscheinlich.

Zusammenfassend lassen unsere Ergebnisse vermuten, dass die verminderte Inhibition im proinflammatorischen Th17-Milieu weniger auf eine Dysfunktion der Tregs, als vielmehr auf eine Resistenz der Effektor-Zellen zurückzuführen ist. Die für die Suppressionsfähigkeit der Tregs essenzielle FoxP3-Expression ist in besagtem Ansatz sogar hochreguliert, weiterhin war hier die tendenziell niedrigste IL-17-Produktion zu verzeichnen. Eine FoxP3-Instabilität oder ein proinflammatorischer Phänotyp der Tregs als Ursache der verminderten Inhibition scheint damit unwahrscheinlich.

Was im Ansatz der Treg-Charakterisierung nicht untersucht wurde und daher einen möglichen Aspekt der verminderten Suppressionsfunktion der Tregs auslöst, ist die Produktion immunsuppressiver, antiproliferativer Zytokine durch die Tregs wie TGF $\beta$  oder IL-10. So fanden Ugor et al. bei Systemsklerose-Patienten zwar erhöhte FoxP3-Spiegel, jedoch eine verminderte Zytokinproduktion von TGF $\beta$  und IL-10 [135].

Alternativ wäre der Grund einer verminderten Inhibition auf Seiten der Effektor-Zellen/PBMCs zu suchen, deren Veränderung in unserem Versuchsaufbau ebenfalls nicht näher untersucht wurde. Eine unterschiedliche Sensitivität/Resistenz verschiedener T-Zell-Subpopulationen bei Sklerodermie-Patienten gegenüber der Treg-Suppression wurde bereits in einer anderen Versuchsreihe unserer Arbeitsgruppe gesehen [136].

Eine Resistenzentwicklung der Effektor-Zellen gegenüber der Treg-Suppression wurde bereits von Pasare et al. beschrieben. Hier wurde v.a. der Einfluss von IL-6 auf die Aktivierung von T-Zellen und die damit verbundene Überwindung der Treg-vermittelten Suppression festgestellt [137].

Diese Hypothese wurde auch in einer Studie von Wehrens et al. verifiziert. Bei der Untersuchung von Tregs aus entzündeter Synovialflüssigkeit von JIA-

Patienten ergab sich ein im Vergleich zum peripheren Blut erhöhter FoxP3-Gehalt der CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>-Tregs. Der Demethylierungsstatus der Promoter-Region war hierbei gleich, was eine ähnliche Stabilität der FoxP3-Expression vermuten lässt. Auch die Suppressionsfunktion der Synovial-Tregs unterschied sich nicht zu der der Tregs aus dem Blut der Patienten. Allerdings zeigten bei Cokultur mit Effektor-Zellen aus dem inflammatorischen Gebiet sowohl die Tregs aus der Synovialflüssigkeit als auch die aus dem peripheren Blut Inhibitionsdefizite. Ursächlich für diese Resistenz der PBMCs waren die in der Synovialflüssigkeit ermittelten Zytokine TNF $\alpha$  und IL-6 und die damit verbundene Aktivierung der Proteinkinase B (PKB/c-akt) [138]. Die Arbeitsgruppe um Haufe bestätigte diese These und fand ebenfalls eine vermehrte Resistenz von Synovial-Effektor-T-Zellen gegenüber Tregs bei gleichzeitig erhaltener Suppressionsfunktion der Synovial-Tregs gegenüber Effektor-Zellen aus dem peripheren Blut von JIA-Patienten. Sie ermittelte außerdem eine inverse Korrelation zwischen mangelnder Suppression und Aktivierungszustand der Effektor-T-Zellen bei erhöhtem Aktivierungsgrad der T-Zellen in der Synovialflüssigkeit [74]. Betrachtet man nun das Zytokinmilieu der arthritischen Synovialflüssigkeit und vergleicht es mit dem von uns verwendeten Th17-Ansatz (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23, TGF $\beta$ ), so lassen sich große Parallelen feststellen, welche die Korrelation der Ergebnisse der genannten Studien mit der von uns festgestellten Suppressionsminderung im Th17-Milieu bei gleichzeitig erhaltenem Treg-Phänotyp bestärken. Analysen der Synovialflüssigkeit von JIA-Patienten zeigten u.a. eine Erhöhung von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$  sowie einigen weiteren proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen [104, 139, 140].

Zwar könnte aufgrund der berichteten erhöhten IL-17-Spiegel in der Synovialflüssigkeit von JIA-Patienten [55] ebenfalls ein Einfluss auf besagte Effektorzellresistenz gegenüber den Tregs vermutet werden, jedoch zeigte sich in unseren Ergebnissen im Gegensatz zum Th17-Milieu kein signifikanter Unterschied bzgl. der Inhibition im IL-17-Milieu. Eine Veränderung der Suppression durch die Tregs im anti-IL-17-Ansatz oder im Medikamentenansatz ist deshalb nicht zu erwarten, was sich in unseren Versuchen bestätigt hatte.

IL-17-Spiegel wurden als korrelierend mit der Krankheitsaktivität bei JIA-Patienten beschrieben [55]. Es lässt sich vermuten, dass der Einfluss von IL-17 auf die JIA dabei weniger über einen Zusammenhang mit der Regulationsfunktion des Immunsystems und den Tregs zusammenhängt, als vielmehr über den in Kapitel 1.2.1 beschriebenen Einfluss auf Osteoklasten, Vaskularisation und Chondrozyten direkt eine lokale Gewebeschädigung bewirkt. Zusätzlich ist zu vermerken, dass IL-17 u.a. die Sekretion von IL-6 aus Fibroblasten und Synoviozyten fördert [56], was zu einer indirekten Aggravierung der Resistenzmechanismen von Effektor-Zellen gegenüber der Treg-Suppression führen könnte. Da in dem Versuchsaufbau dieser Arbeit keine der genannten Zellen für die Wirkmechanismen zur Verfügung standen, bliebe die Inhibition der Effektor-Zellen durch die Tregs im IL-17-Ansatz ungestört. Die Hemmung von IL-17 führte in Versuchen und im klinischen Setting zu einer Besserung von arthritischen Veränderungen und gleichzeitig zu niedrigeren IL-6 und IL-1 $\beta$ -Spiegeln in der Synovia [68, 78]. Der fehlende Einfluss von anti-IL-17 auf die Inhibitionsfunktion der Tregs könnte daher auf den in unserem Versuchsaufbau fehlenden indirekten IL-6- und IL-1 $\beta$ -Einfluss zurückzuführen sein.

#### **5.4 Interpretation des Einflusses der Medikation auf die Ergebnisse**

Lediglich 6,3 % der Patienten (= 1 Patient) hatten zum Blutentnahmezeitpunkt keinerlei Basistherapie. Weitere 2 Patienten (= 12,5 %) erhielten ein NSAR. Alle anderen 13 Patienten standen unter Einfluss eines Immunsuppressivums. Diese Medikamentenklasse dient der Verhinderung schädlicher Immunreaktionen und wirkt je nach Mechanismus zytotoxisch/zytostatisch auf die Lymphozyten, hemmend auf die T-Zellaktivierung oder die Signaltransduktion und Zytokinwirkung [141]. Die gewünschte Modulation der Immunantwort hat daher auch einen Einfluss auf die von uns gemessenen Ergebnisse.

Bei 43,75 % der Patienten enthielt die Basistherapie MTX. MTX wirkt antiproliferativ durch einen pro-apoptischen Einfluss auf aktivierte T-Zellen

[142]. Dies könnte ein weiterer Erklärungsansatz für die durchschnittlich verminderte Proliferationsrate der PBMCs (enthalten u.a. aktivierte Lymphozyten) der Patientenkohorte in den Suppressions-Assays (vgl. Kapitel 5.3) sein.

MTX bewirkt weiterhin eine Reduktion der Zytokinproduktion. Ein supprimierender Einfluss auf Sekretion von TNF $\alpha$  und zytotoxischen Zytokinen wie Granzym A und B wurde festgestellt [143]. Dies wäre eine zusätzliche Begründung für die verminderte Produktion zytotoxischer Zytokine der CD4<sup>+</sup>TEMRA- und CD4<sup>+</sup>-Effektor-Zellen in der Patientengruppe in der PBMC-Charakterisierung (vgl. Kapitel 5.1.2.1). Eine Glukokortikoidtherapie besitzt ebenfalls eine zytokinreduzierende Eigenschaft durch Senkung des NF $\kappa$ B-Faktors [144].

Als ein weiterer wichtiger Punkt der MTX-Wirkung wird neuerdings die Stabilisierung der FoxP3-Expression durch Demethylierung des Enhancer-Genlocus, sowie eine verstärkte FoxP3-Expression auf Tregs diskutiert [145]. Dieser Ansatz könnte eine generell erhöhte FoxP3-Expression in der Patientengruppe bei der Treg- und PBMC-Charakterisierung erklären (vgl. Kapitel 5.2.1.1 und 5.1.4). MTX scheint außerdem die IL-10-Produktion zu erhöhen [62], was teilweise die höheren IL-10-Spiegel der Patientenzellen in der PBMC-Charakterisierung mit erklären könnte (vgl. Kapitel 5.1.4).

Einige Patienten erhielten abgesehen von der Basistherapie eine Vitamin D-Supplementation. Es wird diskutiert, ob Vitamin D eine ähnliche Wirkung auf Treg-Funktion und -Entwicklung habe wie Vitamin A [18]. Neueste Studien sprechen sowohl Vitamin A als auch Vitamin D eine Erhöhung der FoxP3-Expression zu [124]. Eine Ergänzungstherapie mit Vitamin D könnte sich also auf Treg-Anzahl, -Funktion und Charakteristika in der Patientenkohorte ausgewirkt haben.

In der Psoriasisbehandlung mit MTX stellten Priyadarssini et al. eine Reduktion von Th1- und Th17- sowie eine Erhöhung der Th2- und Treg-Zahlen fest [146]. Ähnlich konnten auch Lina et al. einen Shift von Th17-dominierenden Zellen im Blut von RA-Patienten hin zu mehr Treg-Zellen unter Etanercept+MTX-Therapie

messen. Gleichzeitig sanken die Zytokinspiegel für IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-17, IL-23 und der Spiegel für TGF $\beta$  stieg [110]. Die Therapie könnte auch bei unseren JIA-Proben großen Einfluss nehmen. Die höheren Treg-Zahlen der Patienten in Treg- und PBMC-Charakterisierung und die niedrigere Anzahl an ROR $\gamma$ <sup>t</sup>-Th17-Zellen in der PBMC-Charakterisierung könnten z.T. dadurch erklärt werden (vgl. Kapitel 5.2.1.1 und 5.1.4 bzw. Kapitel 5.1.5). Der Einfluss von Abatacept hingegen senkt die Treg-Anzahl bei RA-Patienten, wobei die verbleibenden Tregs einen stärkeren suppressiven Effekt auf die Lymphozytenproliferation besitzen [147]. Bei der geringeren ROR $\gamma$ <sup>t</sup>-Th17-Zahl bleibt außerdem zu beachten, dass die Spiegel der IL-17<sup>+</sup>-Zellen in unseren Messungen in der Patientenkohorte stets höher waren als die in der Kontrollkohorte. Daher bietet der Therapieeinfluss diesbezüglich nur eine teilweise oder unzureichende Erklärung der Ergebnisse.

Maggi et al. postulierten in ihrem Review eine Abnahme des stark pathogenen CD161<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>-Th17/Th1-Phänotyps in JIA-Patienten unter Etanercept-behandlung [127]. In unserer Studie konnten wir keinen signifikanten Unterschied der CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>-Th17/Th1-Zellen zwischen Patienten und Kontrollen messen, jedoch eine eher erniedrigte IFN $\gamma$ -Produktion in den Th17-Zellsubpopulationen in der Patientenkohorte feststellen (vgl. Kapitel 5.1.3), was u.U. auch auf den Einfluss der Biologika-Therapie in der Patientengruppe mit Senkung z.B. der CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>-Zellen zurückzuführen zu sein könnte. Weiterhin stellten Maggi et al. eine geminderte Resistenz gegenüber der Suppression von Effektor-Zellen durch Tregs fest (über eine Reduktion der PKB/c-akt-Level) [127]. Eine TNF $\alpha$ -Inhibitor-Therapie in der Patientengruppe könnte daher einen Einfluss auf die Ergebnisse der Suppressions-Assays gehabt haben, und zwar dahingehend, dass der Unterschied (der generell etwas geminderten Inhibition in der Patientengruppe in allen Stimuli) insgesamt geringer ausgefallen ist, als er es ohne Therapie möglicherweise wäre (vgl. Kapitel 5.3).

## 5.5 Limitationen der Studie

### 5.5.1 Probandenabhängige Limitationen

Die in unserer Arbeit verwendete Probenanzahl fiel mit insgesamt 16 Patienten und 10 gesunden Probanden eher gering aus. Die statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test und die Verwendung der exakten Signifikanz berücksichtigte dies jedoch in der Auswertung und lässt die Ergebnisse daher repräsentativ werden.

Aufgrund logistischer Schwierigkeiten, minderjährige gesunde Kontrollen innerhalb der Kinderklinik der Universität Würzburg zu rekrutieren, wurden für die Kontrollgruppe volljährige junge Erwachsene zur Probengewinnung herangezogen. Daraus ergab sich ein signifikanter Altersunterschied bei der PBMC-Charakterisierung und den Suppressions-Assays. Aufgrund der Immunseneszenz vollziehen sich im Laufe des Lebens einige Änderungen bzgl. der einzelnen Bestandteile des Immunsystems. So sinkt die Lymphozytenanzahl mit zunehmendem Alter. Die CD4<sup>+</sup>-Zellzahl sinkt zunächst im Laufe der Kindheit und steigt wieder ab dem jungen Erwachsenenalter. Die CD8<sup>+</sup>-Zellen hingegen nehmen bis ins Erwachsenenalter stetig zu. Auch die Zytokinproduktion verändert sich, v.a. zwischen Erwachsenen und Senioren [148]. Ein Einfluss des Altersunterschiedes auf die Ergebnisse kann daher nicht ausgeschlossen werden. Laut Mayerl et al. hängt eine geringere Lymphozytenreifung im Thymus bei gleichzeitig erhöhter kompensatorischer Proliferation reifer T-Zellen in der Peripherie mit einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen sowie steigender Autoimmunität im fortgeschrittenen Alter zusammen. Eine verfrühte Reifung des Immunsystems bei JIA-Patienten wird diskutiert [149]. So wurden bei JIA-Patienten eine Abnahme von Naiven- und eine Zunahme von Memory-T-Zellen festgestellt [150]. Ferner werden bei der RA gerade diese verfrüht gereiften Memory-CD4<sup>+</sup>-Zellen als hyperproliferativ und proinflammatorisch angesehen [96]. Auch dies könnte einen Einfluss auf die Ergebnisse dieser Arbeit gehabt haben.

## 5.5.2 Methodenabhängige Limitationen

### 5.5.2.1 Zellgewinnung und MACS-Separation

Die Proben der Patientenkohorte wurden per Eilkurier von der Klinik in Garmisch-Partenkirchen an das Labor der AG Prelog an die Universitätsklinik Würzburg versandt. Trotz der möglichst schnellen Verarbeitung kann es aufgrund der Transportzeiten verglichen mit den Kontrollproben zu einem ungewollten Verlust an vitalen PBMCs gekommen sein.

Die Blutentnahmen wurden gewichtsadaptiert durchgeführt. D.h. bei jungen, leichten Patienten konnte vergleichsweise nur wenig Blut entnommen werden, was sich auch auf die Anzahl isolierter Lymphozyten auswirkte. Da sich die Tregs im peripheren Blut auf ca. 5-10 % der CD4<sup>+</sup>-Zellen belaufen [2], konnten (v.a. in der Patientenkohorte) nach Einfrier-, Auftau- und Separationsverfahren nur eine sehr geringe Anzahl an Tregs gewonnen werden. Dies wirkte sich vermutlich auf die Reinheit der Tregs in der MACS-Separation aus. Kleine Zellpopulationen lassen sich schwerer isolieren als große Populationen [84]. Während des MACS-Verfahrens sterben die Zellen teilweise ab [151]. Die Reinheit der Tregs von durchschnittlich 74,7 % hat wahrscheinlich eine gewisse Kontamination der Kulturen mit Effektor-Zellen nach sich gezogen, die einen Einfluss auf Suppressions- und Zytokinproduktionsfunktion in den Versuchen gehabt haben könnten.

### 5.5.2.2 Zellkultur

Die Zellzahlen für die Zellkulturen waren aufgrund der Isolierungsmethoden relativ gering. Für die CFSE-Suppressionskultur sind jedoch relativ hohe Zellzahlen nötig [152], unsere Treg-Zahlen waren oft an der Untergrenze der möglichen Versuchsdurchführung. Dies könnte aufgrund niedrigerer Zell-Zellkontakte einen Einfluss auf Stimulation und Proliferation gehabt haben.

Ob die Ergebnisse der Treg-Charakterisierung 1:1 auf die Suppressions-Assays anwendbar sind, ist zu diskutieren. Zum Großteil wurden hier aufgrund der limitierten Zellzahl andere Proben verwendet. D.h. die höhere FoxP3-Expression bzw. die erniedrigte IL-17-Produktion der Tregs im Th17-Ansatz der Treg-



Charakterisierung und die Suppressionsminderung im Th17-Ansatz des Suppressions-Assays können aufgrund des gleichen Versuchsaufbaus zwar gemeinsam betrachtet werden, jedoch ist ein individueller direkter Zusammenhang nicht als zwangsläufig anzunehmen.

Marek et al. beschrieb eine Minderung der Suppressionsfähigkeit (korrelierend mit der FoxP3-Expression) der Tregs bei verlängerter ex vivo Zeit [153]. Die in dieser Arbeit verwendete Kulturzeit von fünf Tagen liegt hierbei jedoch deutlich unter der als kritisch genannten zweiwöchigen Inkubationszeit, sodass die Ergebnisse als realistisch anzunehmen sind. Ferner ist ein Vergleich des Stimuluseinflusses aufgrund gleicher Rahmenbedingungen weiterhin möglich.

Zahlreiche Arbeiten konnten zeigen, dass sich Tregs in vitro anders verhalten als in vivo. Beispielsweise wurde ein anerges bis hypoproliferatives Verhalten in in-vitro-Experimenten beobachtet, während Tregs in vivo selbst unter Ruhebedingungen als stark proliferativ betrachtet werden [4, 154]. Sakaguchi et al. postulierten hier einen IL-2-Mangel in regulären Kulturbedingungen als ursächlich [32]. Eine 1:1-Übertragbarkeit des Treg-Verhaltens inklusive Suppressionsfunktion aus In-vitro-Versuchen auf das menschliche Immunsystem erscheint deshalb nicht vollständig möglich.

Als weitere mögliche Limitation sollte eine unzureichende IL-17-Dosis als Stimulus der Zellkultur diskutiert werden. Die in Autoimmunerkrankungen festgestellte positive Korrelation zwischen IL-17 und Krankheitsaktivität, sowie der verstärkte proinflammatorische Einfluss von IL-17 in Kombination mit anderen proinflammatorischen Zytokinen wie TNF $\alpha$  [68] lassen einen relevanten Einfluss des Zytokins auf Pathogenese und Erhalt autoimmuner Erkrankungen vermuten. Ob IL-17 in unserem Versuchsansatz aufgrund einer zu geringen Dosis keine signifikanten Effekte auf Funktion und Phänotyp der Tregs hatte oder aber die pathogenen Einflüsse des Zytokins über komplexe Zusammenspiele mit anderen Zytokinen, umgebenden synovialen Strukturen oder durch epigenetische Veränderungen der Zellen hervorgerufen werden, lässt sich durch unseren Versuchsaufbau nicht abschließend klären.

### 5.5.2.3 *Durchflusszytometrie*

Die bei der Durchflusszytometrie gemessenen Merkmale der Zellen beliefen sich gerade in den Subpopulationen teilweise lediglich auf wenige Prozent. Eine so geringe Anzahl an Ereignissen ist fehleranfällig. Auch das Gaten der Subpopulationen war bei geringen Zellzahlen aufgrund unscharfer Populationsgrenzen z.T. schwierig.

Weiterhin ist aufgrund der Vielseitigkeit der T-Zellen eine genaue Definition der Subpopulationen stark diskutiert. In unterschiedlichen Studien wurden diverse Definitionen für Tregs, Th17-Zellen und plastische Zellen verwendet. Viele Marker werden von einer Vielzahl an Zellen exprimiert. So werden FoxP3 und CD25 in aktivierten Zellen hochreguliert [6, 22]. Laut Sakaguchi et al. ist FoxP3 der spezifischste Treg-Marker [32]. In vielen Studien, sowie in dieser Arbeit, werden hingegen aufgrund der besseren Handhabung CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Zellen als Tregs definiert [155]. Ähnlich umstritten diskutiert ist die genaue Definition der Th17-Zellen über ROR $\gamma$ t, IL-17, CCR6 oder CD161 [19]. Eine Vergleichbarkeit der einzelnen Arbeiten wird daher häufig durch unterschiedliche Populationsdefinitionen erschwert.

Die Stimulation mittels PMA/Ionomycin zu Beginn der Färbeprozedur hat auch Auswirkungen auf die Zytokinproduktion. Verglichen mit anderen Stimulationen wurde signifikant mehr IFN $\gamma$  und IL-17 gemessen, bei gleichzeitig verminderter IL-10-Produktion [102]. Wie stark sich die Stimulation auf die jeweiligen Zellen auswirkt und ob bzw. welchen Einfluss sie auf die Unterschiede zwischen den Probengruppen haben könnte, bleibt fraglich (vgl. Kapitel 5.1.2.2).

## **5.6 Konklusion**

Die in unserer Arbeit durchgeführten Versuche zeigten in der PBMC-Charakterisierung die Unterschiede des Lymphozytenpools zwischen JIA-Probanden und gesunden Kontrollen auf. Es konnte in Patientenlymphozyten eine erhöhte Chemokinrezeptorexpression sowie eine erhöhte Zytotoxizität v.a. der Naiven- und Memory-Zellen festgestellt werden. Diese Konstellation könnte eine vermehrte Neigung des Immunsystems von JIA-Patienten hin zu

entzündlichen Prozessen widerspiegeln. Insbesondere die verringerte ROR $\gamma$ t-Expression bei erhöhtem IL-17-Spiegel in den Patienten lässt Schlüsse auf einen anderen Ursprung des Zytokins als klassische Th17-Zellen zu. Auch der erhöhte Anteil an Th17-spezifischen Faktoren wie CCR6 oder IL-17 Expression bei Tregs in der JIA-Gruppe zeigt den zentralen Aspekt, den plastische Tregs in der Pathogenese dieser Erkrankung einnehmen. Wir konnten mit den Ergebnissen der PBMC-Charakterisierung die bereits in anderen Arbeiten vermutete Dysbalance zwischen Th1/Th17- und Treg-Zellen bei der Genese der JIA untermauern. Wann die Plastizität der Tregs weg von einer Effektorzell-spezifischen Immunantwort hin zu einem autoimmunen Geschehen kippt, gilt es noch zu erforschen.

Die erhöhte FoxP3-Expression auf Tregs durch die Kultur in proinflammatorischem Th17-Milieu lässt eine vermehrte Zellaktivierung durch die Inflammation vermuten. Zeitgleich lag in diesem Milieu eine eingeschränkte Suppression der PBMC-Proliferation durch Tregs vor. Am ehesten ist dieses Ergebnis auf eine verstärkte Resistenzentwicklung der Effektor-Zellen im inflammatorischen Milieu zurückzuführen und eröffnet so einen neuen pathophysiologischen Ansatz in der Genese der JIA.

Während das Th17-Milieu Auswirkungen auf den Phänotyp der Tregs und die Inhibitionsresistenz der Effektor-Zellen hatte, so zeigte sich im IL-17-Ansatz selbst keinerlei Einfluss, was entweder bedeutet, dass die proinflammatorischen Eigenschaften von IL-17 in unserem Versuchsaufbau nicht miterfasst wurden (bspw. durch IL-1 $\beta$ - und IL-6-Wirkung) oder der IL-17-Stimulus zu niedrig dosiert war, um einen direkten Einfluss auf Treg-Phänotyp und Funktion sichtbar zu machen.

Während die FoxP3-Expression insbesondere im Th17-Milieu, aber auch im unspezifischen anti-IL17A-Milieu in der Patientengruppe deutlich erhöht war, glich sich die FoxP3-Expression der Tregs an die der gesunden Kontrollen nach Kultur mit Secukinumab an. Dieser Aspekt kann einen zusätzlichen Add-on Benefit der IL-17A-Blockade in der JIA darstellen, der somit zu einer intrinsischen Stabilisierung der Treg-Rolle in der Kontrolle der Inflammation führen könnte. Die

bereits bei anderen autoimmunen Krankheitsbildern beschriebene erhöhte Sensitivität der Tregs für inflammatorische Stimuli mit entweder vermehrter Aktivierung oder vermehrter Plastizität hin zum inflammatorischen Phänotyp ist ein wichtiger Ansatzpunkt für mögliche zukünftige Therapien. Durch Modulation des inflammatorischen Milieus könnte somit der suppressiv bzw. regulatorisch wirkende Treg-Phänotyp rekonstituiert oder stabilisiert werden.

Schlussfolgernd stellen die Ergebnisse dieser Arbeit weitere Einblicke in den wichtigen Bereich der Treg/Th17-Balance und Zellplastizität bei der Genese von Autoimmunerkrankungen dar. Aufgrund immer neuer Erkenntnisse können Therapieoptionen für Autoimmunerkrankungen, wie Treg-Transfer oder Mesenchymale-Stammzell-Therapie zur Wiederherstellung der Treg/Th17-Balance sowie ein Biomarker-gesteuertes Krankheitsmonitoring entwickelt werden [96, 114, 156]. Unsere Ergebnisse veranschaulichen und differenzieren ferner mögliche Einflussmechanismen von IL-17-Antikörpern auf die JIA. Secukinumab wurde mittlerweile bei bestimmten Unterformen der JIA wie der Psoriasisarthritis und der Enthesitis-assoziierten Arthritis durch die FDA und seit Juni 2022 auch durch die EMA als Therapie zugelassen [64, 67] (vgl. Kapitel 1.3.5).

## **5.7 Ausblick**

In unseren Versuchen wurde zur Oberflächenmolekül-, intrazellulären Zytokin- und Transkriptionsfaktoren-Detektion die Durchflusszytometrie verwendet. Eine Bestätigung unserer Ergebnisse mit weiteren Verfahren, beispielsweise mit Transkriptom- und Sekretom-Analysen auf Single-Cell Basis ist v.a. aufgrund der z.T. sehr geringen Mengen an Zytokinen bzw. Transkriptionsfaktoren sowie geringen Zellzahl, wünschenswert.

Aufgrund geringer Probenmengen und niedriger Zellzahlen gelang es uns nicht, genügend Zellen für eine weitere Charakterisierungsanalyse vor der Kultur zu isolieren. Eine Möglichkeit für zukünftige Experimente wäre, sich auf weniger Stimuli zu konzentrieren und dafür eine Prä- und Poststimulations-Analyse

anzufertigen, um dadurch z.B. Aussagen bzgl. der FoxP3-Expression vor Kultur treffen zu können.

Wir stellten in der EAA eine erhöhte IL-17-Produktion bei gleichzeitig erniedrigten Treg-Spiegeln fest. Hierin könnte die Ursache einer effektiveren klinischen Wirkung von Secukinumab bei Spondyloarthritis im Vergleich zu anderen Rheuma-Formen liegen. Für die Treg-Charakterisierung und Suppressions-Assays wurden aufgrund der besseren Verfügbarkeit die häufigere Oligoarthritis und seronegative Polyarthritis verwendet. Eine Erweiterung unseres Versuchsaufbaus zur Betrachtung der Stimuli-Effekte auf EAA-Lymphozyten wäre wünschenswert, um eventuelle Unterschiede in der Wirkung auf die dort vorhandenen Tregs zu erkennen.

Eine genauere Untersuchung der PBMC-Zellen nach Kultur im Th17-Milieu mit Fokus auf die Proteinkinase-B-Mechanismen und Signalwege zur Differenzierung genauer Effektorzell-Resistenzmechanismen könnte mögliche Therapieansätze bergen.

Epigenetische Aspekte erlangen gerade im Bereich der Plastizität der einzelnen T-Zelllinien immer mehr Relevanz. Eine Analyse wichtiger Genregionen wie der Transkriptionsfaktoren FoxP3 oder ROR $\gamma$ t oder deren genregulierenden Abschnitte vor bzw. nach Kultur scheint ein interessanter Ansatzpunkt zu sein. Künftige Fragestellungen, die aus dieser Arbeit resultieren, könnten sein, ob die FoxP3-Region der Patienten wirklich so moduliert ist, dass sie in Kultur stabiler ist bzw. ob die vermehrte FoxP3-Expression lediglich auf eine induzierte Expression durch Zellaktivierung zurückzuführen ist; oder wie das inverse Verhalten von FoxP3 und ROR $\gamma$ t bei gleichzeitig hohem IL-17-Spiegel in der Patientengruppe zu erklären ist. Pathologische Veränderungen in diesen Untersuchungen könnten neue Therapieansätze hervorbringen.

Aufgrund sehr diverser Ergebnisse in unterschiedlichen Arbeiten bzgl. Treg- und Th17-Zellzahl, sowie Zytokinexpression im peripheren Blut von JIA-Patienten erscheint eine Untersuchung mit größerer Probandenzahl sinnvoll. Weiterhin wäre es interessant, unseren Versuchsaufbau mit Synovialzellen betroffener Patienten durchzuführen, um ggf. Unterschiede zur Reaktion der Zellen auf die

Stimuli im Vergleich zu Zellen des peripheren Blutes festzustellen. Dadurch kann der Pathomechanismus der JIA noch genauer eruiert werden. Da es sich bei der JIA um eine chronische Erkrankung handelt, wäre eine Kultur von Zellen mit den entsprechenden Stimuli über einen längeren Zeitraum eine Möglichkeit, chronische Entzündungsprozesse zu simulieren und deren Auswirkung auf Phänotyp, Funktion, sowie Epigenetik der Tregs und anderer Zelllinien zu beobachten. Hier stellt sich allerdings das Problem, dass eine lange Treg-Kultivierung bisher automatisch mit FoxP3-Verlust und Suppressionsminderung einherging [153].

Je mehr Verständnis über zugrunde liegende pathologische Prozesse und Veränderungen des Immunsystems von JIA-Patienten erlangt werden kann, desto spezifischer und erfolgreicher können Therapiestrategien und –ansätze für diese chronische Erkrankung des Kindesalters entwickelt werden.

## 6 Zusammenfassung

In der nicht vollständig geklärten Pathogenese der JIA spielen insbesondere Effektor-T-Zellen und Tregs, sowie das Kontinuum ihrer plastischen Zelltypen eine wichtige Rolle. Im arthritischen Milieu, das auch IL-17 beinhaltet, verschiebt sich das Gleichgewicht dieser Zellen hin zur Inflammation. Ziel dieser Arbeit war es, die T-Zellbalance im peripheren Blut von JIA-Patienten mit gesunden Kontrollen (HC) zu vergleichen, sowie den Einfluss von IL-17, anti-IL-17 und eines Th17-stimulierenden, proinflammatorischen Zytokinmilieus auf Phänotyp und Funktion der Tregs zu untersuchen.

Es erfolgte die durchflusszytometrische Analyse des Lymphozytenpools von 16 JIA- und 10 HC-Probanden. Isolierte CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs wurden mit den genannten Stimuli kultiviert und danach durchflusszytometrisch phänotypisch sowie in Co-Kultur mit PBMCs auf ihre Suppressionsfunktion untersucht.

Wir stellten erhöhte Proportionen von Th17-Zellen, Tregs und effector-like Tregs in JIA-Patienten fest. Bei Stimulation mit dem Th17-Cocktail zeigte sich eine verminderte Suppression der Effektor-Zellen durch Tregs bei zeitgleich vermehrter FoxP3-Expression insbesondere in JIA-Tregs. Secukinumab bewirkte eine Anpassung der FoxP3-Expression der Tregs in der Patientengruppe auf etwa das Niveau der gesunden Kontrollen.

Insgesamt bestätigt diese Arbeit eine proinflammatorische Dysbalance bei JIA-Patienten mit Shift zu Th17-like Tregs als möglicherweise pathologischen Phänotyp. Ursache für die verminderte Suppression ist vermutlich eine gesteigerte Resistenz der Effektor-Zellen durch das Inflammationsmilieu. Die vermehrte FoxP3-Expression der JIA-Tregs ist am ehesten durch eine gesteigerte Zellaktivierung zu erklären. Diese erhöhte Sensitivität der Tregs für inflammatorische Stimuli mit vermehrter Aktivierung ist ein möglicher Ansatzpunkt für zukünftige Therapien. Die Adjustierung der FoxP3-Expression unter Secukinumab in der JIA-Gruppe auf Niveau der Kontrollen bildet daher einen denkbaren zusätzlichen therapeutischen Effekt der IL-17A Blockade durch potenzielle intrinsische Stabilisierung des Phänotyps der Tregs bei der JIA ab.

## 7 Abstract

**Background and Objective:** As the exact pathophysiology of Juvenile Idiopathic Arthritis (JIA) is yet not fully resolved, an important focus of research lays nowadays in the delicate balance between regulatory T cells (Tregs) and effector T-cells. In an arthritic milieu, involving Interleukin 17 (IL-17), plasticity towards proinflammatory cell types is seen. The aim of the study was to analyze the distribution of Tregs and effector T-cells in the peripheral blood of JIA patients and healthy controls (HC). Besides that, the influence of IL-17, of anti-IL-17 and of a Th17-stimulating environment on phenotype and function of Tregs was investigated to determine a possible drift away from or towards an antiinflammatory immune status.

**Methods:** Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from blood samples of 16 JIA patients and 10 HC and compared for differences in the lymphocytes' characteristics. Isolated CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs were analyzed with flow cytometry after cultivation with the above-mentioned stimulating agents. Furthermore, suppression assays were performed to assess the Treg-mediated inhibition on proliferation of autologous PBMC proliferation after co-culture.

**Results:** A shift towards pro-inflammatory T cells with elevated Th17-levels and concomitant increased amount of Tregs and Th17-like Tregs in JIA patients was detected. A diminished suppression of PBMC proliferation by Tregs in the Th17-stimulation environment was determined. This environment also promoted an increased FoxP3-expression on Tregs, especially in JIA. Secukinumab lead to adjustment of FoxP3-expression in JIA-Tregs to levels found in HC.

**Conclusion:** Our results implicate that the increased proportions of Th17 cells and Th17-like Tregs might play an important part in the pathophysiology of JIA mediating the proinflammatory dysbalance. The mitigated inhibition of PBMC-proliferation in the Th17-environment is most likely the result of an effector cell resistance. The augmented FoxP3-expression in Th17-environment may be due to an increased cell activation, which especially JIA Tregs were prone to. This increased sensitivity of Tregs to inflammation might open new therapeutic



approaches. The difference of FoxP3-activation was less pronounced after cultivation with Secukinumab, suggesting an adjustment of Treg activation in JIA to levels found in HC. This could demonstrate an additional benefit in IL-17A-inhibition in JIA possibly via intrinsically stabilizing the Treg phenotype.

## 8 Literatur

1. Lüllmann-Rauch R (2015) Taschenbuch Histologie, 5. Aufl. Thieme, Stuttgart
2. Murphy KM, Weaver C, Janeway C (2018) Janeway Immunologie, 9. Aufl. Springer Spektrum, Berlin
3. Abbas AK, Lichtman AHH, Pillai S (2014) Cellular and Molecular Immunology E-Book (Cellular and Molecular Immunology, Abbas), 8. Aufl. Saunders
4. Wagner N, Dannecker G (2014) Pädiatrische Rheumatologie, 2. Aufl. Springer, Berlin
5. Moran AE, Hogquist KA (2012) T-cell receptor affinity in thymic development. *Immunology* 135(4):261–267. doi:10.1111/j.1365-2567.2011.03547.x
6. Josefowicz SZ, Lu L-F, Rudensky AY (2012) Regulatory T cells. Mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol* 30:531–564. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623
7. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401(6754):708–712. doi:10.1038/44385
8. Chen L, Flies DB (2013) Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 13(4):227–242. doi:10.1038/nri3405
9. Larbi A, Fulop T (2014) From "truly naive" to "exhausted senescent" T cells. When markers predict functionality. *Cytometry A* 85(1):25–35. doi:10.1002/cyto.a.22351
10. Appay V, van Lier RAW, Sallusto F, Roederer M (2008) Phenotype and function of human T lymphocyte subsets. Consensus and issues. *Cytometry A* 73(11):975–983. doi:10.1002/cyto.a.20643
11. Cai Y, Shen X, Ding C, Qi C, Li K, Li X, Jala VR, Zhang H, Wang T, Zheng J, Yan J (2011) Pivotal role of dermal IL-17-producing gammadelta T cells in skin inflammation. *Immunity* 35(4):596–610. doi:10.1016/j.immuni.2011.08.001
12. Guery L, Hugues S (2015) Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity. *Biomed Res Int* 2015:314620. doi:10.1155/2015/314620
13. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA (2010) FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 10(7):490–500. doi:10.1038/nri2785
14. Gershon RK, Kondo K (1970) Cell interactions in the induction of tolerance. The role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18(5):723–737
15. Lio C-WJ, Hsieh C-S (2008) A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity* 28(1):100–111. doi:10.1016/j.immuni.2007.11.021
16. Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S (2013) Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity* 38(3):414–423. doi:10.1016/j.immuni.2013.03.002

17. Savage PA, Klawon DEJ, Miller CH (2020) Regulatory T Cell Development. *Annu Rev Immunol* 38:421–453. doi:10.1146/annurev-immunol-100219-020937
18. Campbell DJ, Koch MA (2011) Phenotypic and functional specialization of FOXP3(+) regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 11(2):119–130. doi:10.1038/nri2916
19. Fasching P, Stradner M, Graninger W, Dejaco C, Fessler J (2017) Therapeutic Potential of Targeting the Th17/Treg Axis in Autoimmune Disorders. *Molecules* 22(1). doi:10.3390/molecules22010134
20. Nakano S, Morimoto S, Suzuki S, Tsushima H, Yamanaka K, Sekigawa I, Takasaki Y (2015) Immunoregulatory role of IL-35 in T cells of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 54(8):1498–1506. doi:10.1093/rheumatology/keu528
21. Liu R, Li S, Yang W-H, Wang L (2013) IPEX Syndrome, FOXP3 and Cancer. *J Syndr* 1(1)
22. Zheng Y, Rudensky AY (2007) Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol* 8(5):457–462. doi:10.1038/ni1455
23. Nistala K, Wedderburn LR (2009) Th17 and regulatory T cells. Rebalancing pro- and anti-inflammatory forces in autoimmune arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 48(6):602–606. doi:10.1093/rheumatology/kep028
24. Stadhouders R, Lubberts E, Hendriks RW (2018) A cellular and molecular view of T helper 17 cell plasticity in autoimmunity. *Journal of Autoimmunity* 87:1–15. doi:10.1016/j.jaut.2017.12.007
25. Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK (2007) T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* 8(4):345–350. doi:10.1038/ni0407-345
26. Farh KK-H, Marson A, Zhu J, Kleinewietfeld M, Housley WJ, Beik S, Shores N, Whitton H, Ryan RJH, Shishkin AA, Hatan M, Carrasco-Alfonso MJ, Mayer D, Luckey CJ, Patsopoulos NA, Jager PL de, Kuchroo VK, Epstein CB, Daly MJ, Hafler DA, Bernstein BE (2015) Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants. *Nature* 518(7539):337–343. doi:10.1038/nature13835
27. Maggi L, Mazzoni A, Cimaz R, Liotta F, Annunziato F, Cosmi L (2019) Th17 and Th1 Lymphocytes in Oligoarticular Juvenile Idiopathic Arthritis. *Front Immunol* 10:450. doi:10.3389/fimmu.2019.00450
28. Ivanova EA, Orekhov AN (2015) T Helper Lymphocyte Subsets and Plasticity in Autoimmunity and Cancer. An Overview. *Biomed Res Int* 2015:327470. doi:10.1155/2015/327470
29. Kleinewietfeld M, Hafler DA (2013) The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Semin Immunol* 25(4):305–312. doi:10.1016/j.smim.2013.10.009
30. Pandiyan P, Zhu J (2015) Origin and functions of pro-inflammatory cytokine producing Foxp3+ regulatory T cells. *Cytokine* 76(1):13–24. doi:10.1016/j.cyto.2015.07.005

31. Dong Y, Pan F (2021) Ubiquitin-Dependent Regulation of Treg Function and Plasticity. In: Zheng S-G (Hrsg) T Regulatory Cells in Human Health and Diseases. Springer Singapore, Singapore, S 63–80
32. Sakaguchi S, Vignali DAA, Rudensky AY, Niec RE, Waldmann H (2013) The plasticity and stability of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 13(6):461–467. doi:10.1038/nri3464
33. Hagenstein J, Melderis S, Nosko A, Warkotsch MT, Richter JV, Ramcke T, Herrnstadt GR, Scheller J, Yan I, Mittrücker H-W, Kluger MA, Steinmetz OM (2019) A Novel Role for IL-6 Receptor Classic Signaling: Induction of ROR $\gamma$ t(+)Foxp3(+) Tregs with Enhanced Suppressive Capacity. *J Am Soc Nephrol* 30(8):1439–1453. doi:10.1681/ASN.2019020118
34. Beriou G, Costantino CM, Ashley CW, Yang L, Kuchroo VK, Baecher-Allan C, Hafler DA (2009) IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood* 113(18):4240–4249. doi:10.1182/blood-2008-10-183251
35. Astry B, Venkatesha SH, Moudgil KD (2015) Involvement of the IL-23/IL-17 axis and the Th17/Treg balance in the pathogenesis and control of autoimmune arthritis. *Cytokine* 74(1):54–61. doi:10.1016/j.cyto.2014.11.020
36. Kirkham BW, Kavanaugh A, Reich K (2014) Interleukin-17A. A unique pathway in immune-mediated diseases: psoriasis, psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. *Immunology* 141(2):133–142. doi:10.1111/imm.12142
37. Koskull S von, Truckenbrodt H, Holle R, Hormann A (2001) Incidence and prevalence of juvenile arthritis in an urban population of southern Germany. A prospective study. *Ann Rheum Dis* 60(10):940–945. doi:10.1136/ard.60.10.940
38. Eisenstein EM, Berkun Y (2014) Diagnosis and classification of juvenile idiopathic arthritis. *Journal of Autoimmunity* 48-49:31–33. doi:10.1016/j.jaut.2014.01.009
39. Petty RE, Southwood TR, Manners P, Baum J, Glass DN, Goldenberg J, He X, Maldonado-Cocco J, Orozco-Alcala J, Prieur A-M, Suarez-Almazor ME, Woo P (2004) International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis. Second revision, Edmonton, 2001. *J Rheumatol* 31(2):390–392
40. Martini A, Ravelli A, Avcin T, Beresford MW, Burgos-Vargas R, Cuttica R, Ilowite NT, Khubchandani R, Laxer RM, Lovell DJ, Petty RE, Wallace CA, Wulffraat NM, Pistorio A, Ruperto N, for the Pediatric Rheumatology International Trials Organization (2019) Toward New Classification Criteria for Juvenile Idiopathic Arthritis: First Steps, Pediatric Rheumatology International Trials Organization International Consensus. *J Rheumatol* 46(2):190. doi:10.3899/jrheum.180168
41. Ravelli A, Martini A (2007) Juvenile idiopathic arthritis. *The Lancet* 369(9563):767–778. doi:10.1016/S0140-6736(07)60363-8
42. Prakken B, Albani S, Martini A (2011) Juvenile idiopathic arthritis. *The Lancet* 377(9783):2138–2149. doi:10.1016/S0140-6736(11)60244-4

43. Correll CK, Binstadt BA (2014) Advances in the pathogenesis and treatment of systemic juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Res* 75(1-2):176–183. doi:10.1038/pr.2013.187
44. Giacomelli R, Ruscitti P, Shoefeld Y (2018) A comprehensive review on adult onset Still's disease. *Journal of Autoimmunity* 93:24–36. doi:10.1016/j.jaut.2018.07.018
45. Prahalad S, Glass DN (2008) A comprehensive review of the genetics of juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Rheumatol Online J* 6:11. doi:10.1186/1546-0096-6-11
46. Cobb JE, Hinks A, Thomson W (2014) The genetics of juvenile idiopathic arthritis. Current understanding and future prospects. *Rheumatology (Oxford)* 53(4):592–599. doi:10.1093/rheumatology/ket314
47. Aggarwal A, Misra DP (2015) Enthesitis-related arthritis. *Clin Rheumatol* 34(11):1839–1846. doi:10.1007/s10067-015-3029-4
48. Rigante D, Bosco A, Esposito S (2015) The Etiology of Juvenile Idiopathic Arthritis. *Clin Rev Allergy Immunol* 49(2):253–261. doi:10.1007/s12016-014-8460-9
49. Ellis JA, Munro JE, Ponsonby A-L (2010) Possible environmental determinants of juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 49(3):411–425. doi:10.1093/rheumatology/kep383
50. Franca CMP, Sallum AME, Braga ALF, Strufaldi FL, Silva CAA, Farhat SCL (2018) Risk Factors Associated with Juvenile Idiopathic Arthritis. Exposure to Cigarette Smoke and Air Pollution from Pregnancy to Disease Diagnosis. *J Rheumatol* 45(2):248–256. doi:10.3899/jrheum.161500
51. Zaripova LN, Midgley A, Christmas SE, Beresford MW, Baidam EM, Oldershaw RA (2021) Juvenile idiopathic arthritis: from aetiopathogenesis to therapeutic approaches. *Pediatr Rheumatol Online J* 19(1):135. doi:10.1186/s12969-021-00629-8
52. Wedderburn LR, Robinson N, Patel A, Varsani H, Woo P (2000) Selective recruitment of polarized T cells expressing CCR5 and CXCR3 to the inflamed joints of children with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 43(4):765–774. doi:10.1002/1529-0131(200004)43:4<765::AID-ANR7>3.0.CO;2-B
53. Wu S-A, Yeh K-W, Lee W-I, Yao T-C, Huang J-L (2016) Persistent improper upregulation of Th17 and TReg cells in patients with juvenile idiopathic arthritis. *J Microbiol Immunol Infect* 49(3):402–408. doi:10.1016/j.jmii.2014.07.002
54. Nistala K, Moncrieffe H, Newton KR, Varsani H, Hunter P, Wedderburn LR (2008) Interleukin-17-producing T cells are enriched in the joints of children with arthritis, but have a reciprocal relationship to regulatory T cell numbers. *Arthritis Rheum* 58(3):875–887. doi:10.1002/art.23291
55. Agarwal S, Misra R, Aggarwal A (2008) Interleukin 17 levels are increased in juvenile idiopathic arthritis synovial fluid and induce synovial fibroblasts to produce proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases. *J Rheumatol* 35(3):515–519

56. Chabaud M, Lubberts E, Joosten L, van den Berg W, Miossec P (2001) IL-17 derived from juxta-articular bone and synovium contributes to joint degradation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 3(3):168–177. doi:10.1186/ar294
57. Mistry RR, Patro P, Agarwal V, Misra DP (2019) Enthesitis-related arthritis: current perspectives. *Open Access Rheumatol* 11:19–31. doi:10.2147/OARRR.S163677
58. Filocamo G, Consolaro A, Schiappapietra B, Dalpra S, Lattanzi B, Magni-Manzoni S, Ruperto N, Pistorio A, Pederzoli S, Civino A, Guseinova D, Masala E, Viola S, Martini A, Ravelli A (2011) A new approach to clinical care of juvenile idiopathic arthritis. The Juvenile Arthritis Multidimensional Assessment Report. *J Rheumatol* 38(5):938–953. doi:10.3899/jrheum.100930
59. Onel KB, Horton DB, Lovell DJ et al (2022) 2021 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Juvenile Idiopathic Arthritis: Therapeutic Approaches for Oligoarthritis, Temporomandibular Joint Arthritis, and Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 74(4):521–537. doi:10.1002/acr.24853
60. Oommen PT, Schütz C, Baltruschat K, Deuter C, Foeldvari I, Ganser G, Haas J-P, Thon MW, Wagner N, Rheuma-Liga D S2k-Leitlinie „Therapie der Juvenilen Idiopathischen Arthritis“ (3. Auflage, 2019)
61. Ringold S, Angeles-Han ST, Beukelman T, Lovell D, Cuello CA, Becker ML, Colbert RA, Feldman BM, Ferguson PJ, Gewanter H, Guzman J, Horonjeff J, Nigrovic PA, Ombrello MJ, Passo MH, Stoll ML, Rabinovich CE, Schneider R, Halyabar O, Hays K, Shah AA, Sullivan N, Szymanski AM, Turgunbaev M, Turner A, Reston J (2019) 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the Treatment of Juvenile Idiopathic Arthritis: Therapeutic Approaches for Non-Systemic Polyarthritis, Sacroiliitis, and Enthesitis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 71(6):717–734. doi:10.1002/acr.23870
62. Chan ESL, Cronstein BN (2002) Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. *Arthritis Res* 4(4):266–273. doi:10.1186/ar419
63. Ringold S, Weiss PF, Beukelman T, DeWitt EM, Ilowite NT, Kimura Y, Laxer RM, Lovell DJ, Nigrovic PA, Robinson AB, Vehe RK (2013) 2013 update of the 2011 American College of Rheumatology recommendations for the treatment of juvenile idiopathic arthritis. Recommendations for the medical therapy of children with systemic juvenile idiopathic arthritis and tuberculosis screening among children receiving biologic medications. *Arthritis Rheum* 65(10):2499–2512. doi:10.1002/art.38092
64. Gallagher A, Assistant Editor (2022) FDA Approves Cosentyx for New Indications. *Pharmacy Times*
65. Ruperto N, Foeldvari I, Alexeeva E, Aktay Ayaz N, Calvo I, Kasapcopur O, Chasnyk V, Hufnagel M, Žuber Z, Schulert G, Ozen S, Popov A, Ramanan A, Scott C, Sözeri B, Zholobova E, Zhu X, Whelan S, Pricop L, Ravelli A, Martini A, Lovell DJ, Brunner H (2021) LB0004 EFFICACY AND SAFETY

- OF SECUKINUMAB IN ENTHESITIS-RELATED ARTHRITIS AND JUVENILE PSORIATIC ARTHRITIS: PRIMARY RESULTS FROM A RANDOMISED, DOUBLE-BLIND, PLACEBO-CONTROLLED, TREATMENT WITHDRAWAL, PHASE 3 STUDY (JUNIPERA). *Ann Rheum Dis* 80(Suppl 1):201. doi:10.1136/annrheumdis-2021-eular.5038
66. Blair HA (2021) Secukinumab: A Review in Moderate to Severe Pediatric Plaque Psoriasis. *Paediatr Drugs* 23(6):601–608. doi:10.1007/s40272-021-00476-w
  67. CHMP Cosentyx, INN-secukinumab
  68. Beringer A, Noack M, Miossec P (2016) IL-17 in Chronic Inflammation. From Discovery to Targeting. *Trends in Molecular Medicine* 22(3):230–241. doi:10.1016/j.molmed.2016.01.001
  69. Szymanska-Kaluza J, Cebula-Obrzut B, Smolewski P, Stanczyk J, Smolewska E (2014) Imbalance of Th17 and T-regulatory cells in peripheral blood and synovial fluid in treatment naive children with juvenile idiopathic arthritis. *Cent Eur J Immunol* 39(1):71–76. doi:10.5114/ceji.2014.42128
  70. Onel KB, Horton DB, Lovell DJ et al (2022) 2021 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Juvenile Idiopathic Arthritis: Recommendations for Nonpharmacologic Therapies, Medication Monitoring, Immunizations, and Imaging. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 74(4):505–520. doi:10.1002/acr.24839
  71. Soler DC, McCormick TS (2011) The dark side of regulatory T cells in psoriasis. *J Invest Dermatol* 131(9):1785–1786. doi:10.1038/jid.2011.200
  72. Pesenacker AM, Wedderburn LR (2013) T regulatory cells in childhood arthritis--novel insights. *Expert Rev Mol Med* 15:e13. doi:10.1017/erm.2013.14
  73. Kleer IM de, Wedderburn LR, Taams LS, Patel A, Varsani H, Klein M, Jager W de, Pugayung G, Giannoni F, Rijkers G, Albani S, Kuis W, Prakken B (2004) CD4+CD25bright regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. *J Immunol* 172(10):6435–6443
  74. Haufe S, Haug M, Schepp C, Kuemmerle-Deschner J, Hansmann S, Rieber N, Tzaribachev N, Hospach T, Maier J, Dannecker GE, Holzer U (2011) Impaired suppression of synovial fluid CD4+CD25- T cells from patients with juvenile idiopathic arthritis by CD4+CD25+ Treg cells. *Arthritis Rheum* 63(10):3153–3162. doi:10.1002/art.30503
  75. Pavelka K, Kivitz AJ, Dokoupilova E, Blanco R, Maradiaga M, Tahir H, Wang Y, Porter BO, Stefanska A, Richards HB, Rohrer S (2020) Secukinumab 150/300 mg Provides Sustained Improvements in the Signs and Symptoms of Active Ankylosing Spondylitis. 3-Year Results from the Phase 3 MEASURE 3 Study. *ACR Open Rheumatol* 2(2):119–127. doi:10.1002/acr2.11102
  76. Koenders MI, van den Berg WB (2016) Secukinumab for rheumatology. Development and its potential place in therapy. *Drug Des Devel Ther* 10:2069–2080. doi:10.2147/DDDT.S105263

77. Blanco FJ, Moricke R, Dokoupilova E, Coddling C, Neal J, Andersson M, Rohrer S, Richards H (2017) Secukinumab in Active Rheumatoid Arthritis. A Phase III Randomized, Double-Blind, Active Comparator- and Placebo-Controlled Study. *Arthritis Rheumatol* 69(6):1144–1153. doi:10.1002/art.40070
78. Lubberts E, Koenders MI, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Coenen-de Roo CJJ, Joosten LAB, van den Berg WB (2004) Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum* 50(2):650–659. doi:10.1002/art.20001
79. Bundesärztekammer (Hrsg) (2013) Deutsche Fassung der Deklaration von Helsinki: Ethische Grundsätze für die medizinische Forschung (Stand: 2013)
80. Consolaro A, Ruperto N, Bazso A, Pistorio A, Magni-Manzoni S, Filocamo G, Malattia C, Viola S, Martini A, Ravelli A (2009) Development and validation of a composite disease activity score for juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 61(5):658–666. doi:10.1002/art.24516
81. Boyum A (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97:77–89
82. Luttmann W (2014) *Der Experimentator Immunologie*, 4. Aufl. *Der Experimentator*. Springer Spektrum, Berlin
83. Smagur A, Mitrus I, Giebel S, Sadius-Wojciechowska M, Najda J, Kruzel T, Czerw T, Gliwinska J, Prokop M, Glowala-Kosinska M, Chwieduk A, Holowiecki J (2013) Impact of different dimethyl sulphoxide concentrations on cell recovery, viability and clonogenic potential of cryopreserved peripheral blood hematopoietic stem and progenitor cells. *Vox Sang* 104(3):240–247. doi:10.1111/j.1423-0410.2012.01657.x
84. Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A (1990) High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11(2):231–238. doi:10.1002/cyto.990110203
85. Miltenyi Biotec GmbH (Hrsg) (2012) CD4+CD25+CD127 dim/– Regulatory T Cell Isolation Kit II. Data Sheet
86. BD Biosciences (Hrsg) (2002) *Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide*. Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA 95131, United States of America
87. Crawford TQ, Jalbert E, Ndhlovu LC, Barbour JD (2014) Concomitant evaluation of PMA+ionomycin-induced kinase phosphorylation and cytokine production in T cell subsets by flow cytometry. *Cytometry A* 85(3):268–276. doi:10.1002/cyto.a.22444
88. Chatila T, Silverman L, Miller R, Geha R (1989) Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *J Immunol* 143(4):1283–1289



89. Klausner RD, Donaldson JG, Lippincott-Schwartz J (1992) Brefeldin A. Insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* 116(5):1071–1080
90. Misumi Y, Miki K, Takatsuki A, Tamura G, Ikehara Y (1986) Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* 261(24):11398–11403
91. Frauwirth KA, Thompson CB (2002) Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J. Clin. Invest.* 109(3):295–299. doi:10.1172/JCI200214941
92. Hombach AA, Kofler D, Hombach A, Rapp G, Abken H (2007) Effective proliferation of human regulatory T cells requires a strong costimulatory CD28 signal that cannot be substituted by IL-2. *J Immunol* 179(11):7924–7931
93. Chowdhury F, Johnson P, Williams AP (2010) Enumeration and phenotypic assessment of human plasmacytoid and myeloid dendritic cells in whole blood. *Cytometry A* 77(4):328–337. doi:10.1002/cyto.a.20872
94. Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E (2013) The who's who of T-cell differentiation. Human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol* 43(11):2797–2809. doi:10.1002/eji.201343751
95. Macaubas C, Nguyen K, Milojevic D, Park JL, Mellins ED (2009) Oligoarticular and polyarticular JIA. Epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol* 5(11):616–626. doi:10.1038/nrrheum.2009.209
96. Luque-Campos N, Contreras-López RA, Jose Paredes-Martínez M, Torres MJ, Bahraoui S, Wei M, Espinoza F, Djouad F, Elizondo-Vega RJ, Luz-Crawford P (2019) Mesenchymal Stem Cells Improve Rheumatoid Arthritis Progression by Controlling Memory T Cell Response. *Front Immunol* 10. doi:Review
97. Tian Y, Babor M, Lane J, Schulten V, Patil VS, Seumois G, Rosales SL, Fu Z, Picarda G, Burel J, Zapardiel-Gonzalo J, Tennekoon RN, Silva AD de, Premawansa S, Premawansa G, Wijewickrama A, Greenbaum JA, Vijayanand P, Weiskopf D, Sette A, Peters B (2017) Unique phenotypes and clonal expansions of human CD4 effector memory T cells re-expressing CD45RA. *Nat Commun* 8(1):1473. doi:10.1038/s41467-017-01728-5
98. Takeuchi A, Saito T (2017) CD4 CTL, a Cytotoxic Subset of CD4+ T Cells, Their Differentiation and Function. *Front Immunol* 8:194. doi:10.3389/fimmu.2017.00194
99. Chemin K, Gerstner C, Malmström V (2019) Effector Functions of CD4+ T Cells at the Site of Local Autoimmune Inflammation-Lessons From Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol* 10:353. doi:10.3389/fimmu.2019.00353
100. Shanahan F, Niederlehner A, MacDermott RP, Stenson WF, Kane MG, Targan S (1986) Inhibition of cytotoxicity by sulfasalazine. II. Sulfasalazine and sulfapyridine inhibit different stages of the NK and NKCF lytic processes. *Immunopharmacology* 11(2):111–118. doi:10.1016/0162-3109(86)90031-7

101. Baran J, Kowalczyk D, Ozog M, Zembala M (2001) Three-color flow cytometry detection of intracellular cytokines in peripheral blood mononuclear cells. Comparative analysis of phorbol myristate acetate-ionomycin and phytohemagglutinin stimulation. *Clin Diagn Lab Immunol* 8(2):303–313. doi:10.1128/CDLI.8.2.303-313.2001
102. Olsen I, Sollid LM (2013) Pitfalls in determining the cytokine profile of human T cells. *J Immunol Methods* 390(1):106–112. doi:10.1016/j.jim.2013.01.015
103. Wehrens EJ, Vastert SJ, Mijnheer G, Meerding J, Klein M, Wulffraat NM, Prakken BJ, van Wijk F (2013) Anti-tumor necrosis factor alpha targets protein kinase B/c-Akt-induced resistance of effector cells to suppression in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 65(12):3279–3284. doi:10.1002/art.38132
104. Jager W de, Hoppenreijs EPAH, Wulffraat NM, Wedderburn LR, Kuis W, Prakken BJ (2007) Blood and synovial fluid cytokine signatures in patients with juvenile idiopathic arthritis. A cross-sectional study. *Ann Rheum Dis* 66(5):589–598. doi:10.1136/ard.2006.061853
105. Mahendra A, Misra R, Aggarwal A (2009) Th1 and Th17 Predominance in the Enthesitis-related Arthritis Form of Juvenile Idiopathic Arthritis. *J Rheumatol* 36(8):1730–1736. doi:10.3899/jrheum.081179
106. Paulissen SMJ, van Hamburg JP, Dankers W, Lubberts E (2015) The role and modulation of CCR6+ Th17 cell populations in rheumatoid arthritis. *Cytokine* 74(1):43–53. doi:10.1016/j.cyto.2015.02.002
107. Cosmi L, Cimaz R, Maggi L, Santarasci V, Capone M, Borriello F, Frosali F, Querci V, Simonini G, Barra G, Piccinni MP, Liotta F, Palma R de, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F (2011) Evidence of the transient nature of the Th17 phenotype of CD4+CD161+ T cells in the synovial fluid of patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 63(8):2504–2515. doi:10.1002/art.30332
108. Sznurkowska K, Bockowska M, Zielinski M, Plata-Nazar K, Trzonkowski P, Liberek A, Kaminska B, Szlagatys-Sidorkiewicz A (2018) Peripheral regulatory T cells and anti-inflammatory cytokines in children with juvenile idiopathic arthritis. *Acta Biochim Pol* 65(1):119–123. doi:10.18388/abp.2017\_2308
109. Olivito B, Simonini G, Ciullini S, Moriondo M, Betti L, Gambineri E, Cantarini L, Martino M de, Azzari C, Cimaz R (2009) Th17 transcription factor RORC2 is inversely correlated with FOXP3 expression in the joints of children with juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 36(9):2017–2024. doi:10.3899/jrheum.090066
110. Lina C, Conghua W, Nan L, Ping Z (2011) Combined treatment of etanercept and MTX reverses Th1/Th2, Th17/Treg imbalance in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol* 31(4):596–605. doi:10.1007/s10875-011-9542-6

111. Yu Y, Ma X, Gong R, Zhu J, Wei L, Yao J (2018) Recent advances in CD8(+) regulatory T cell research. *Oncology letters* 15(6):8187–8194. doi:10.3892/ol.2018.8378
112. Zou Q, Wu B, Xue J, Fan X, Feng C, Geng S, Wang M, Wang B (2014) CD8+ Treg cells suppress CD8+ T cell-responses by IL-10-dependent mechanism during H5N1 influenza virus infection. *Eur J Immunol* 44(1):103–114. doi:10.1002/eji.201343583
113. Kleer I de, Vastert B, Klein M, Teklenburg G, Arkesteijn G, Yung GP, Albani S, Kuis W, Wulffraat N, Prakken B (2006) Autologous stem cell transplantation for autoimmunity induces immunologic self-tolerance by reprogramming autoreactive T cells and restoring the CD4+CD25+ immune regulatory network. *Blood* 107(4):1696–1702. doi:10.1182/blood-2005-07-2800
114. Baker KF, Rayner F, Lemos H, McDonald D, Hulme G, Hussain R, Coxhead J, Pratt A, Anderson AE, Filby A, Isaacs J (2022) OP0074 DISTINCT CIRCULATING LYMPHOCYTE SUBSETS DISTINGUISH FLARE FROM DRUG-FREE REMISSION IN RHEUMATOID ARTHRITIS. *Ann Rheum Dis* 81(Suppl 1):50. doi:10.1136/annrheumdis-2022-eular.1341
115. Wang X, Zhang Y, Yang XO, Nurieva RI, Chang SH, Ojeda SS, Kang HS, Schluns KS, Gui J, Jetten AM, Dong C (2012) Transcription of Il17 and Il17f is controlled by conserved noncoding sequence 2. *Immunity* 36(1):23–31. doi:10.1016/j.immuni.2011.10.019
116. Zhao L, Nocturne G, Haskett S, Boudaoud S, Lazure T, Le Pajolec C, Mariette X, Mingueneau M, Banerjee D (2017) Clinical relevance of RORgamma positive and negative subsets of CD161+CD4+ T cells in primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 56(2):303–312. doi:10.1093/rheumatology/kew360
117. Henderson LA, Hoyt KJ, Lee PY, Rao DA, Jonsson AH, Nguyen JP, Rutherford K, Julé AM, Charbonnier L-M, Case S, Chang MH, Cohen EM, Dedeoglu F, Fuhlbrigge RC, Halyabar O, Hazen MM, Janssen E, Kim S, Lo J, Lo MS, Meidan E, Son MBF, Sundel RP, Stoll ML, Nusbaum C, Lederer JA, Chatila TA, Nigrovic PA (2020) Th17 reprogramming of T cells in systemic juvenile idiopathic arthritis. *JCI Insight* 5(6). doi:10.1172/jci.insight.132508
118. Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, Nakashima T, Oh-hora M, Kodama T, Tanaka S, Bluestone JA, Takayanagi H (2014) Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nat Med* 20(1):62–68. doi:10.1038/nm.3432
119. Rubtsov YP, Niec RE, Josefowicz S, Li L, Darce J, Mathis D, Benoist C, Rudensky AY (2010) Stability of the regulatory T cell lineage in vivo. *Science* 329(5999):1667–1671. doi:10.1126/science.1191996
120. Bending D, Paduraru A, Ducker CB, Prieto Martín P, Crompton T, Ono M (2018) A temporally dynamic Foxp3 autoregulatory transcriptional circuit controls the effector programme. *EMBO J* 37(16). doi:10.15252/embj.201899013

121. Copland A, Bending D (2018) Foxp3 Molecular Dynamics in Treg in Juvenile Idiopathic Arthritis. *Front Immunol* 9:1701. doi:10.3389/fimmu.2018.02273
122. Koenen HJ, Smeets RL, Vink PM, van Rijssen E, Boots AM, Joosten I (2008) Human CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>pos</sup> regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood* 112(6):2340–2352. doi:10.1182/blood-2008-01-133967
123. Li X, Zheng Y (2015) Regulatory T cell identity. Formation and maintenance. *Trends Immunol* 36(6):344–353. doi:10.1016/j.it.2015.04.006
124. Shi H, Chi H (2019) Metabolic Control of Treg Cell Stability, Plasticity, and Tissue-Specific Heterogeneity. *Front Immunol* 10:2716. doi:10.3389/fimmu.2019.02716
125. Bending D, Pesenacker AM, Ursu S, Wu Q, Lom H, Thirugnanabalan B, Wedderburn LR (2014) Hypomethylation at the regulatory T cell-specific demethylated region in CD25<sup>hi</sup> T cells is decoupled from FOXP3 expression at the inflamed site in childhood arthritis. *J Immunol* 193(6):2699–2708. doi:10.4049/jimmunol.1400599
126. Black APB, Bhayani H, Ryder CAJ, Gardner-Medwin JMM, Southwood TR (2002) T-cell activation without proliferation in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res* 4(3):177–183. doi:10.1186/ar403
127. Maggi L, Cosmi L, Simonini G, Annunziato F, Cimaz R (2016) T cell subpopulations in juvenile idiopathic arthritis and their modifications after biotherapies. *Autoimmun Rev* 15(12):1141–1144. doi:10.1016/j.autrev.2016.09.012
128. Dominguez-Villar M, Hafler DA (2018) Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nat Immunol* 19(7):665–673. doi:10.1038/s41590-018-0120-4
129. Dominguez-Villar M, Baecher-Allan CM, Hafler DA (2011) Identification of T helper type 1-like, Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in human autoimmune disease. *Nat Med* 17(6):673–675. doi:10.1038/nm.2389
130. Jorn Bovenschen H, van de Kerkhof PC, van Erp PE, Woestenenk R, Joosten I, Koenen HJ (2011) Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells of Psoriasis Patients Easily Differentiate into IL-17A-Producing Cells and Are Found in Lesional Skin. *Journal of Investigative Dermatology* 131(9):1853–1860. doi:10.1038/jid.2011.139
131. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, Roncarolo MG, Levings MK (2007) Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol* 19(4):345–354. doi:10.1093/intimm/dxm014
132. Xu L, Kitani A, Fuss I, Strober W (2007) Cutting edge. Regulatory T cells induce CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF- $\beta$ . *J Immunol* 178(11):6725–6729

133. Zheng SG, Wang J, Horwitz DA (2008) Cutting edge. Foxp3+CD4+CD25+ regulatory T cells induced by IL-2 and TGF-beta are resistant to Th17 conversion by IL-6. *J Immunol* 180(11):7112–7116
134. McClymont SA, Putnam AL, Lee MR, Esensten JH, Liu W, Hulme MA, Hoffmüller U, Baron U, Olek S, Bluestone JA, Brusko TM (2011) Plasticity of human regulatory T cells in healthy subjects and patients with type 1 diabetes. *J Immunol* 186(7):3918–3926. doi:10.4049/jimmunol.1003099
135. Ugor E, Simon D, Almanzar G, Pap R, Najbauer J, Németh P, Balogh P, Prelog M, Czirják L, Berki T (2017) Increased proportions of functionally impaired regulatory T cell subsets in systemic sclerosis. *Clin Immunol* 184:54–62. doi:10.1016/j.clim.2017.05.013
136. Almanzar G, Schmalzing M, Klein M, Hillgardt D, Morris P, Höfner K, Hajj NE, Kneitz H, Wild V, Rosenwald A, Benoit S, Hamm H, Tony H-P, Haaf T, Goebeler M, Prelog M (2019) Memory CD4+ T cells lacking expression of CCR7 promote pro-inflammatory cytokine production in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Eur J Dermatol* 29(5):468–476. doi:10.1684/ejd.2019.3645
137. Pasare C, Medzhitov R (2003) Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 299(5609):1033–1036. doi:10.1126/science.1078231
138. Wehrens EJ, Mijnheer G, Durland CL, Klein M, Meerding J, van Loosdregt J, Jager W de, Sawitzki B, Coffey PJ, Vastert B, Prakken BJ, van Wijk F (2011) Functional human regulatory T cells fail to control autoimmune inflammation due to PKB/c-akt hyperactivation in effector cells. *Blood* 118(13):3538–3548. doi:10.1182/blood-2010-12-328187
139. Kutukculer N, Caglayan S, Aydogdu F (1998) Study of pro-inflammatory (TNF-alpha, IL-1alpha, IL-6) and T-cell-derived (IL-2, IL-4) cytokines in plasma and synovial fluid of patients with juvenile chronic arthritis. Correlations with clinical and laboratory parameters. *Clin Rheumatol* 17(4):288–292
140. Madson KL, Moore TL, Lawrence JM3, Osborn TG (1994) Cytokine levels in serum and synovial fluid of patients with juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 21(12):2359–2363
141. Graefe KH, Lutz W, Bönisch H (2016) *Pharmakologie und Toxikologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
142. Genestier L, Paillot R, Fournel S, Ferraro C, Miossec P, Revillard JP (1998) Immunosuppressive properties of methotrexate. Apoptosis and clonal deletion of activated peripheral T cells. *J. Clin. Invest.* 102(2):322–328. doi:10.1172/JCI2676
143. Pizarro TT, Malinowska K, Kovacs EJ, Clancy J, JR, Robinson JA, Piccinini LA (1994) Diminished cytotoxic gene expression in rat cardiac transplants with low-dose cyclosporine/methotrexate combination therapy. *Transplantation* 58(2):223–232

144. Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, Baldwin AS, JR (1995) Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 270(5234):283–286
145. Cribbs AP, Kennedy A, Penn H, Amjadi P, Green P, Read JE, Brennan F, Gregory B, Williams RO (2015) Methotrexate Restores Regulatory T Cell Function Through Demethylation of the FoxP3 Upstream Enhancer in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol* 67(5):1182–1192. doi:10.1002/art.39031
146. Priyadarssini M, Chandrashekar L, Rajappa M (2018) Effect of methotrexate monotherapy on T-cell subsets in the peripheral circulation in psoriasis. *Clin Exp Dermatol*. doi:10.1111/ced.13795
147. Cooles FAH, Isaacs JD, Anderson AE (2013) Treg cells in rheumatoid arthritis. An update. *Curr Rheumatol Rep* 15(9):352. doi:10.1007/s11926-013-0352-0
148. Valiathan R, Ashman M, Asthana D (2016) Effects of Ageing on the Immune System. Infants to Elderly. *Scand J Immunol* 83(4):255–266. doi:10.1111/sji.12413
149. Mayerl C, Prelog M (2012) Immunosenescence and juvenile idiopathic arthritis. *Autoimmun Rev* 11(5):297–300. doi:10.1016/j.autrev.2010.02.015
150. Prelog M, Schwarzenbrunner N, Sailer-Höck M, Kern H, Klein-Franke A, Ausserlechner MJ, Koppelstaetter C, Brunner A, Duftner C, Dejaco C, Strasak AM, Müller T, Zimmerhackl LB, Brunner J (2008) Premature aging of the immune system in children with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 58(7):2153–2162. doi:10.1002/art.23599
151. Yan H, Ding C, Tian P, Ge G, Jin Z, Jia L, Ding X, Pan X, Xue W (2009) Magnetic cell sorting and flow cytometry sorting methods for the isolation and function analysis of mouse CD4+ CD25+ Treg cells. *J Zhejiang Univ Sci B* 10(12):928–932. doi:10.1631/jzus.B0920205
152. Zhang L, Manirarora JN, Wei C-H (2014) Evaluation of immunosuppressive function of regulatory T cells using a novel in vitro cytotoxicity assay. *Cell Biosci* 4:51. doi:10.1186/2045-3701-4-51
153. Marek N, Bieniaszewska M, Krzystyniak A, Juścińska J, Myśliwska J, Witkowski P, Hellmann A, Trzonkowski P (2011) The time is crucial for ex vivo expansion of T regulatory cells for therapy. *Cell Transplant* 20(11-12):1747–1758. doi:10.3727/096368911X566217
154. Collison LW, Vignali DAA (2011) In vitro Treg suppression assays. *Methods Mol Biol* 707:21–37. doi:10.1007/978-1-61737-979-6\_2
155. Kawashiri S-Y, Kawakami A, Okada A, Koga T, Tamai M, Yamasaki S, Nakamura H, Origuchi T, Ida H, Eguchi K (2011) CD4+CD25(high)CD127(low/-) Treg cell frequency from peripheral blood correlates with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 38(12):2517–2521. doi:10.3899/jrheum.110283
156. Göschl L, Scheinecker C, Bonelli M (2019) Treg cells in autoimmunity: from identification to Treg-based therapies. *Seminars in Immunopathology* 41(3):301–314. doi:10.1007/s00281-019-00741-8

# Appendix

## I Abkürzungsverzeichnis

ANA	Antinukleäre Antikörper
AOSD	Adult Onset Still's Disease
APC	Antigenpräsentierende Zelle
APC (/Cy7/Fire/H7)	Allophycocyanin (/Cyanin7/Fire/H7) (Fluorochrom)
BSA	Bovines Serum Albumin
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
bzw.	Beziehungsweise
BV421	Brilliant Violet 421 (Fluorochrom)
° C	Grad Celsius
CCL	Chemokinligand
CCR	Chemokinrezeptor
CD	Cluster of differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein-succinimidylester
CNS	conserved noncoding sequence
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRP	C-reaktives Protein
CTLs	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> -zytotoxische T-Lymphozyten
CTLA-4	cytotoxic t-lymphocyte associated protein 4
CXCR3	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 3
DAS28	Disease Activity Score 28
DMARD	Disease modifying antirheumatic drug
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
ELISpot Assay	Enzyme Linked Immuno Spot Assay
EMA	Europäische Arzneimittel Agentur
ERAP-1	endoplasmic reticulum aminopeptidase 1
Et al.	et alii/aliae/alia (= und andere)
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluoresceinisothiocyanat (Fluorochrom)
FoxP3	Forkhead-Box-Protein 3
FSC	Forward scatter
g	gramm
GATA3	GATA binding-Protein 3
GITR	Glucocorticoid-induced TNF receptor related protein
G/M-CSF	granulocyte/macrophage colony-stimulation factor
h	hours (Stunden)
HC	healthy control (= gesunde Kontrolle)
HIF	Hypoxie induzierter Faktor
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
ILAR	International League of Associations for Rheumatology
IPEX	X-chromosomale Immunodysregulation Polyendokrinopathie Enteropathie
IRF	Interferon regulatory factor
JADAS	Juvenile Arthritis Disease Activity Score
JIA	Juvenile idiopathische Arthritis sJIA: systemische JIA pOA/eOA: persistend/extended Oligoarthritis RF <sup>+/-</sup> P: Rheumafaktor positive/negative Polyarthritis PsA: Psoriasis-Arthritis EAA: Enthesitis assoziierte Arthritis UD: undifferenzierte Arthritis
M.	Morbus
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MHC/HLA	Major histocompatibility complex (= Haupthistokompatibilitätskomplex)/Human leucocyte antigen
min	Minuten
MIP	Monocyte chemoattractant protein
MTX	Methotrexat
µl	Microliter
ml	Milliliter
mM	Millimol
n	Number = Anzahl
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
ng	Nanogramm
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
n.s.	nicht signifikant
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
NO	Stickstoffmonoxid
PBMC(s)	Peripheral blood mononuclear cell(s)
PBS	Phosphate buffered saline tablets
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE(/Cy7)	Phycoerythrin (-Cyanin 7) (Fluorochrom)
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin-Mix
PerCP (/Cy5.5)	Peridinin-Chlorophyll-Komplex (-Cyanin 5.5) (Fluorochrom)
PLZF	Promyelocytic leukemia zinc finger
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
PTPN22	Protein-tyrosine phosphatase, non-receptor type 22
RA	Rheumatoide Arthritis



RANKL	Receptor activator of NF-κB-Ligand
RF	Rheumafaktor
RORγt	RAR-related orphan receptor γt
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RUNX	Runt-related reanscription factor
sog.	sogenannte
SSC	Sideward scatter
STAT	Signal transducers and activators of transcription
T-bet bzw. TBX21	T-box transcription factor bzw. zugehöriges Gen
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMRA	Terminale Effektor-Memory-Zellen
TGF	Transforming growth factor
Th1/2/17	T-Helfer-Zellen Typ 1, 2, 17
TLR	Toll-like-receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg(s)	regulatorische T-Zelle(n)
nTregs/tTregs	natürliche/aus Thymus stammende Tregs
iTregs/pTregs	in der Peripherie induzierte Tregs
VEGF	vascular endothelial growth factor
vgl.	Vergleiche
z.B.	zum Beispiel
Z.n.	Zustand nach

## II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Differenzierungswege naiver T-Helferzellen .....	7
Abbildung 2: Entwicklung der natürlichen und induzierten Tregs .....	9
Abbildung 3: Darstellung der immunsuppressiven Wirkung einer regulatorischer T-Zelle .....	11
Abbildung 4: Einflussfaktoren auf die Th17-Differenzierung .....	14
Abbildung 5: Entwicklung und Plastizität der Treg und Th17-Zellen .....	18
Abbildung 6: Effekt von IL-17 auf den Arthritis-Mechanismus.....	20
Abbildung 7: Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation .....	48
Abbildung 8: Darstellung der Reinheitsmessung der Treg-Isolierung (=Treg-Purity, hier bei 81,4 % der CD4 <sup>+</sup> -Zellen) .....	52
Abbildung 9: Darstellung des Laserverlaufs bei Auftreffen auf eine Zelle im Durchflusszytometer.....	57
Abbildung 10: Darstellung der Lymphozyten im Durchflusszytometer .....	58
Abbildung 11: Beispielhafte Darstellung des Gatens mittels FACS Diva Software .....	62
Abbildung 12: Negativ- und Positivkontrolle eines Suppressions-Assays im 1:0-Ansatz sowie Positivkontrolle im 1:1-Ansatz .....	64
Abbildung 13: Fehlende Proliferation der PBMCs im Prestimulationsversuch .....	69
Abbildung 14: Positivkontrollen des Suppressions-Assays mit anti-CD3 (A und C) sowie mit anti-CD3/anti-CD28 (B und D) .....	71
Abbildung 15: Vergleich des Reife- und Aktivitätsgrads der CD4 <sup>+</sup> -Zellpopulationen zwischen Patienten- und Kontrollkohorte .....	81
Abbildung 16: Vergleich des Reife- und Aktivitätsgrads der CD8 <sup>+</sup> -Zellpopulationen zwischen Patienten- und Kontrollkohorte .....	83
Abbildung 17: Prozentualer Anteil der zytotoxischen Zytokine in CD4 <sup>+</sup> -Zellen (linke Seite) und CD8 <sup>+</sup> -Zellen (rechte Seite) im Vergleich zwischen Stimulation mit PMA und Ionomycin (oben) und ohne Stimulation (unten) .....	94
Abbildung 18: Th1/Th17-Charakteristika in den CD4 <sup>+</sup> - und CD8 <sup>+</sup> -Zellpopulationen.....	99
Abbildung 19: Treg-Charakteristika in CD4 <sup>+</sup> -Zellen .....	105
Abbildung 20: Treg-Charakteristika in CD8 <sup>+</sup> -Zellen .....	108
Abbildung 21: Th17- und Treg-Balance der CD4 <sup>+</sup> -Zellen in Kontroll- und Patientenkohorte .....	113
Abbildung 22: Anteil der FoxP3 <sup>+</sup> -Zellen an der CD4 <sup>+</sup> -Population in der Patientenkohorte .....	130
Abbildung 23: Anteil der CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> -Zellen an der FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> - (links) bzw. CD4 <sup>+</sup> -Population (rechts) in der Patientenkohorte .....	131
Abbildung 24: Anteil der CCR6 <sup>+</sup> -Zellen an der FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> - (links) und CD4 <sup>+</sup> -Population (rechts) in der Patientenkohorte .....	132
Abbildung 25: Anteil der IL-17 <sup>+</sup> -Zellen an der CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> - (links), CCR6 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> - (mittig) und FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> - Population (rechts) in der Patientenkohorte .....	134
Abbildung 26: Anteil der FoxP3 <sup>+</sup> -Zellen an der CD4 <sup>+</sup> -Population in der Kontrollkohorte .....	135

Abbildung 27: Anteil der CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> -Zellen an der FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> - (links) bzw. CD4 <sup>+</sup> -Population (rechts) in der Kontrollkohorte .....	136
Abbildung 28: Anteil der CCR6 <sup>+</sup> -Zellen an der FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> - (links) und CD4 <sup>+</sup> -Population (rechts) in der Kontrollkohorte .....	137
Abbildung 29: Anteil der IL-17 <sup>+</sup> -Zellen an der CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> - (links), CCR6 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> - (mittig) und FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> - Population (rechts) in der Kontrollkohorte .....	138
Abbildung 30: Vergleich der FoxP3-Expression in % in CD4 <sup>+</sup> -Zellen zwischen Patienten (JIA)- und Kontrollkohorte (HC) .....	140
Abbildung 31: Anteil der IL-17 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> -Zellen an der CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> - (links oben), CCR6 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> - (rechts oben) und FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Population (links unten) in der Kontroll- und Patientenkohorte .....	143
Abbildung 32: Anteil der proliferierten PBMCs in der 1:0-Kultur der Patientenkohorte .....	147
Abbildung 33: Anteil der proliferierten PBMCs in der 1:1-Kultur der Patientenkohorte .....	148
Abbildung 34: Suppressions-Assay Patientenkohorte .....	149
Abbildung 35: Suppressions-Assays der einzelnen Patienten .....	150
Abbildung 36: Anteil der proliferierten PBMCs in der 1:0-Kultur der Kontrollkohorte .....	152
Abbildung 37: Anteil der proliferierten PBMCs in der 1:1-Kultur der Kontrollkohorte .....	153
Abbildung 38: Suppressions-Assay Kontrollkohorte .....	154
Abbildung 39: Suppressions Assays der einzelnen gesunden Probanden ....	155
Abbildung 40: Anteil der proliferierten PBMCs in den beiden Kohorten je nach Stimulus.....	157
Abbildung 41: Anteil der proliferierten PBMCs in 1:1-Cokultur mit Tregs in den beiden Kohorten je nach Stimulus.....	158
Abbildung 42: Vergleich Suppressions-Assays zwischen JIA- und Kontrollkohorte .....	159

### III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Differenzierungsgrade der T-Zellen und Unterteilung in Subpopulationen anhand der Oberflächenmoleküle .....	4
Tabelle 2:	Vergleich der Effektor-CD4 <sup>+</sup> -Zellen .....	6
Tabelle 3:	Kategorien der JIA laut ILAR-Klassifikation (Second Revision aus dem Jahr 2001).....	22
Tabelle 4:	Geräte .....	35
Tabelle 5:	Verbrauchsmaterialien .....	37
Tabelle 6:	Treg-Isolierungskit.....	39
Tabelle 7:	Antikörper, Zytokine, Stimulantien, Hemmstoffe und weitere chemische Verbindungen zur Kultivierung der Zellen .....	40
Tabelle 8:	Antikörper zur Zellfärbung .....	41
Tabelle 9:	Flüssige Medienbestandteile, Trennmedien und Puffer .....	43
Tabelle 10:	Feste Pufferbestandteile .....	43
Tabelle 11:	Gebrauchsfertige Lösungen .....	43
Tabelle 12:	Chemikalien .....	44
Tabelle 13:	Gase .....	44
Tabelle 14:	Ein- und Ausschlusskriterien Probanden .....	45
Tabelle 15:	Stimulantien und deren Konzentrationen für die Zellkultur .....	53
Tabelle 16:	Färbepanel der Treg-Charakterisierung .....	54
Tabelle 17:	Färbepanel der PBMC-Charakterisierung .....	55
Tabelle 18:	T-Zell-Stimulation vor Zellfärbung .....	60
Tabelle 19:	Suppressions-Assay-Ansatz .....	65
Tabelle 20:	Demographische Daten der Studienpopulation.....	72
Tabelle 21:	Klinische Daten der JIA-Patienten.....	73
Tabelle 22:	Demographische Beschreibung der Patienten (JIA)- und Kontrollkohorte (HC) der PBMC-Charakterisierung.....	74
Tabelle 23:	Demographische Beschreibung der mit den Kontrollen zu vergleichenden JIA- und der separierten EAA-Gruppe der PBMC-Charakterisierung .....	75
Tabelle 24:	Laborwerte der Patientenkohorte der PBMC-Charakterisierung.....	76
Tabelle 25:	Reife- und Aktivitätsgrad der Lymphozyten.....	76
Tabelle 26:	PBMC-Charakterisierung des allgemeinen T-Zell-Lymphozytenpools einer gesunden Kontrolle (HC) und eines Patienten (JIA).....	76
Tabelle 27:	Vergleich des Reife- und Aktivitätsgrads der CD4 <sup>+</sup> -Zellen zwischen Patienten- und Kontrollkohorte .....	82
Tabelle 28:	Vergleich des Reife- und Aktivitätsgrads der CD8 <sup>+</sup> -Zellen zwischen Patienten- und Kontrollkohorte .....	84
Tabelle 29:	PBMC-Charakterisierung des zytotoxischen Profils der Lymphozyten einer gesunden Kontrolle (HC) und eines Patienten (JIA) nach Stimulation .....	85
Tabelle 30:	Vergleich des zytotoxischen Profils von CD4 <sup>+</sup> - und CD8 <sup>+</sup> -Zellen bei Kontroll- und Patientenkohorte .....	89

Tabelle 31:	PBMC-Charakterisierung der Zytotoxizität der Lymphozyten einer gesunden Kontrolle (HC) und eines Patienten (JIA) ohne Stimulation .....	91
Tabelle 32:	PBMC-Charakterisierung der Th1-Zell- und Th17-Zell-Verteilung einer gesunden Kontrolle (HC) und eines Patienten (JIA) .....	95
Tabelle 33:	Vergleich der Th1/Th17-Charakteristika in der CD4 <sup>+</sup> -Zellpopulation bei Patienten und Kontrollen.....	99
Tabelle 34:	Vergleich der Th1/Th17-Charakteristika in der CD8 <sup>+</sup> -Zellpopulation bei Patienten und Kontrollen.....	101
Tabelle 35:	PBMC-Charakterisierung der Tregs im Lymphozytenpool einer gesunden Kontrolle (HC) und eines Patienten (JIA).....	102
Tabelle 36:	Vergleich der Treg-Charakteristika der CD4 <sup>+</sup> -Zellen bei Kontroll- und Patientenkohorte.....	106
Tabelle 37:	Treg-Charakteristika der CCR6 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Zellen .....	107
Tabelle 38:	Vergleich der Treg-Charakteristika der CD8 <sup>+</sup> - und CCR6 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> Zellen bei Kontroll- und Patientenkohorte.....	108
Tabelle 39:	PBMC-Charakterisierung der Tregs/Th17-Balance im Lymphozytenpool einer gesunden Kontrolle (HC) und eines Patienten (JIA) .....	109
Tabelle 40:	Vergleich der Th17- und Treg-Balance der CD4 <sup>+</sup> -Zellen bei Kontroll- und Patientenkohorte.....	114
Tabelle 41:	Treg-Charakterisierung einer gesunden Kontrolle (HC) und eines Patienten (JIA).....	115
Tabelle 42:	Demographische Beschreibung der Patienten- (JIA)- und Kontrollkohorte (HC) der Treg-Charakterisierung.....	128
Tabelle 43:	Laborwerte der Patientenkohorte der Treg-Charakterisierung.....	129
Tabelle 44:	Deskriptive Statistik der CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> -Zellen in der FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> - und CD4 <sup>+</sup> -Population in % in der Patientenkohorte .....	131
Tabelle 45:	Deskriptive Statistik der CCR6 <sup>+</sup> -Zellen in der FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> - und CD4 <sup>+</sup> -Population in % in der Patientenkohorte.....	132
Tabelle 46:	Deskriptive Statistik der IL-17 <sup>+</sup> -Zellen in den Populationen CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , CCR6 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> und FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> in der Patientenkohorte.....	133
Tabelle 47:	Deskriptive Statistik der CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> -Zellen in der FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> - und CD4 <sup>+</sup> -Population in % in der Kontrollkohorte .....	135
Tabelle 48:	Deskriptive Statistik der CCR6 <sup>+</sup> -Zellen in der FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> - und CD4 <sup>+</sup> -Population in % in der Kontrollkohorte.....	136
Tabelle 49:	Deskriptive Statistik der IL-17 <sup>+</sup> -Zellen in den Populationen CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , CCR6 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> und FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> in der Kontrollkohorte.....	138
Tabelle 50:	Vergleichende Statistik der FoxP3 <sup>+</sup> -Zellen in CD4 <sup>+</sup> -Zellen bei Kontroll- und Patientenkohorte .....	139
Tabelle 51:	Vergleich des Anteils der IL-17 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> -Zellen in % an den Populationen CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> ,	

	CCR6 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> und FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> zwischen Patienten- und Kontrollgruppe.....	142
Tabelle 52:	Suppressions-Assay einer gesunden Kontrolle (HC) und eines Patienten (JIA).....	144
Tabelle 53:	Demographische Beschreibung der Patienten (JIA)- und Kontrollkohorte (HC) der Suppressions-Assays.....	145
Tabelle 54:	Laborwerte der Patientenkohorte der Suppressions-Assays ..	146
Tabelle 55:	Werte der PBMC-Proliferation im 1:0- und 1:1-Co-Kultur- Ansatz sowie Inhibition der Proliferation durch Tregs in Patienten.....	150
Tabelle 56:	Werte der PBMC-Proliferation im 1:0- und 1:1-Co-Kultur- Ansatz sowie Inhibition der Proliferation durch Tregs in Kontrollen.....	156
Tabelle 57:	Zusammenfassung der Ergebnisse der PBMC- Charakterisierung.....	160
Tabelle 58:	Zusammenfassung der Ergebnisse der Treg- Charakterisierung.....	161
Tabelle 59:	Zusammenfassung der Ergebnisse der Suppressions- Assays .....	162

## **IV Danksagung**

Zuallererst möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Martina Prelog bedanken, die mir diese Promotion ermöglicht hat, mich in regelmäßigen Gesprächen und Laborbesprechungen betreut und in meiner Arbeit mit bereichernden Hinweisen und Ratschlägen begleitet hat. Ihre engagierte und motivierte Betreuung hat mein Interesse an der experimentellen Forschung und insbesondere der Rheumatologie und Immunologie geweckt.

Weiterhin möchte ich mich sehr bei Herrn PD Dr. Giovanni Almanzar bedanken, der mich in die Methodik eingearbeitet und die Arbeit im Labor stets geduldig begleitet hat. Ebenso ein herzliches Dankeschön an Kerstin Höfner für die Hilfe bei der Etablierung der Stimulationsversuche und an die technischen Assistentinnen des Nachbarlabors Barbara Ottensmeier und Gabi Haase sowie an Angelika Will, die immer hilfsbereit und freundlich an Ort und Stelle zur Seite standen. Weiterhin vielen Dank an meine MitpromovendInnen, insbesondere an Robert und Anna für die gegenseitige Unterstützung und die ermunternden Gespräche.

Danke ebenfalls an das Team des Deutschen Zentrums für Kinder- und Jugendrheumatologie für die lehrreiche Famulatur, ihre ansteckende Begeisterung für die Rheumatologie und die Unterstützung bei der Probandenaquirierung sowie an die PatientInnen und deren Eltern, ohne deren Einwilligung zur Teilnahme an der Studie diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Eltern Helene und Johannes für die unermüdliche Unterstützung während des Studiums und für das Dasein in jeglicher Lebenslage. Danke an meine lieben KommilitonInnen, die mir als Freunde zur zweiten Familie geworden sind, vor allem für die Unterstützung der wunderbaren Bib-Crew während der Schreibphase sowie an die KorrekturleserInnen für die hilfreichen Vorschläge.

## V Publikationen und Kongressteilnahmen

### Publikationen

Prelog M, Almanzar G, Stern R, Robrade K, **Holzer MT**, Winzig C, Kleines M, Stiasny K, Meyer T, Speth F, Haas JP. Humoral and cellular immune response to tick-borne-encephalitis (TBE) vaccination depends on booster doses in patients with Juvenile Idiopathic Arthritis (JIA). *Vaccine*. 2021 Sep 24;39(40):5918-5927. doi: 10.1016/j.vaccine.2021.08.029. Epub 2021 Aug 27. PMID: 34462165.

Ruffer, N., Krusche, M., **Holzer, MT**. et al. Differenzialdiagnose eines vaskulitischen Syndroms der unteren Extremität. *Z Rheumatol* (2021). <https://doi.org/10.1007/s00393-021-01044-w>

**Holzer, MT**., Almanzar, G., Woidich, R. et al. Mitigated suppressive function of regulatory T cells (Treg) upon Th17-inducing cytokines in oligo- and polyarticular Juvenile Idiopathic Arthritis (JIA) patients. *Pediatr Rheumatol* 20, 26 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12969-022-00680-z>

Ruffer, N.\*, **Holzer, MT\***, Gkanatsas, Y. et al. Chronische Tropheryma whipplei-Infektion: Eine wichtige Differenzialdiagnose der therapieresistenten Polyarthritiden. *Z Rheumatol* (2022). <https://doi.org/10.1007/s00393-022-01194-5>.  
\*N. Ruffer und M.-T. Holzer teilen sich die Erstautorenschaft

**Holzer MT**, Krusche M, Ruffer N, Haberstock H, Stephan M, Huber TB, Kötter I. New-onset dermatomyositis following SARS-CoV-2 infection and vaccination: a case-based review. *Rheumatol Int*. (2022 Aug 8:1–10.) doi: 10.1007/s00296-022-05176-3

**Holzer MT**; Nies J, Oqueka T, Huber TB, Kötter I, Krusche M. Rescue Therapy with Daratumumab in Refractory MDA5-positive RP-ILD. *Chest* (im Druck)

Herrnstadt G, **Holzer MT**, Steinmetz OM, Kötter I, Melderis S. Nierenbeteiligung bei Kollagenosen. *Z Rheumatol* (im Druck)



## **Kongress-Poster/Abstracts**

In vitro Einfluss von Interleukin-17-Antikörpern auf Phänotyp und Funktion von regulatorischen T-Zellen (Tregs) bei Patienten mit Psoriasis/Psoriasis Arthritis. Woidich R, **Holzer MT**, Almanzar G, Goebeler M, Prelog M. DGRh-Kongress 2017

Impaired FoxP3+ Treg function and epigenetic modulations at the FoxP3 enhancer, promotor and TSDR regions by Th17-inducing cytokines in patients with psoriatic arthritis. Prelog M, Woidich R, Karle L, Radtke D, Almanzar G, **Holzer MT**, Schrufer P, Schmalzing M, Tony HP, Goebeler M, Haaf T. DGRh Kongress 2021

Differenzialdiagnose eines vaskulitischen Syndroms der unteren Extremität. Ruffer N, Krusche M, **Holzer MT**, Hagel C, Kötter I. DGRh Kongress 2021

Dermatomyositis nach SARS-CoV-2-Infektion und -Impfung. **Holzer MT**, Krusche M, Haberstock H, Stephan M, Kötter I. DGRh Kongress 2022

Die therapierefraktäre Polyarthritits – eine Bauchschmerzdiagnose? **Holzer MT**, Ruffer N, Gkanatsas Y, Schinglerova I, Boro D, Krusche M, Kötter I. DGRh Kongress 2022