

Aus der Kinderklinik und Poliklinik

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Christoph Härtel

**Phänotyp und Funktion von Follikulären Helfer Zell-ähnlichen T-Zellen im entzündeten Gelenk von Patientinnen und Patienten mit Juveniler Idiopathischer Arthritis**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Jonas Maria Fischer

aus Wangen im Allgäu

Würzburg, März 2023



Referentin bzw. Referent: Priv.-Doz. Dr. Henner Morbach

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Nicolas Schlegel

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 08.04.2024

Der Promovend ist Arzt

Meiner Familie

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Juvenile Idiopathische Arthritis .....	1
1.1.1	Klinische Manifestation und Klassifikation.....	1
1.1.2	Antinukleäre Antikörper definieren eine klinisch homogene JIA-Subgruppe 4	
1.2	Die Zellen des adaptiven Immunsystems.....	5
1.2.1	B-Zellen .....	6
1.2.2	Differenzierung von B-Zellen.....	7
1.2.3	Die Rolle von B-Zellen in der Pathogenese der JIA.....	10
1.2.4	T-Zellen .....	11
1.2.5	Die antigenabhängige T-Zell-Aktivierung .....	11
1.2.6	Polarisierung von CD4+ T-Helferzellen.....	13
1.2.7	CD4+ T-Helferzellen in den Gelenken von JIA-Patienten .....	16
1.2.8	Follikuläre T-Helferzellen in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen .....	16
1.2.9	Modulare Betrachtung von CD4+ T-Helferzellen mit B-Helfer-Funktion .	19
1.3	Fragestellung der Arbeit .....	21
2	Material und Methoden .....	22
2.1	Ethikvotum .....	22
2.2	Probanden .....	22
2.3	Probenaufbereitung .....	23
2.3.1	Isolierung von mononukleären Zellen.....	23
2.3.2	Vorbereitung der Gelenkproben .....	24
2.4	Durchflusszytometrie Färbeprotokoll .....	24

2.4.1	Stimulation der T-Zytokinansätze.....	24
2.4.2	Oberflächenfärbung .....	24
2.4.2.1	Waschen der Zellen .....	24
2.4.2.2	Färbevorgang.....	24
2.4.3	Intrazelluläre Färbung .....	26
2.5	Durchflusszytometrie .....	27
2.5.1	Grundlagen .....	27
2.5.2	Technische Einstellungen .....	28
2.5.3	Auswertungsstrategien.....	29
2.6	Zellsortierung und Lymphozyten-Kokultur.....	30
2.6.1	Sortierung von Zellpopulationen mittels FACS.....	31
2.6.2	Kokultur-Assays .....	32
2.7	B-Zell <i>in vitro</i> Stimulations-Assays mit rekombinantem IFN- $\gamma$ und IL-21.....	33
2.7.1	Isolation von B-Zellen mittels immunomagnetischer Separation.....	33
2.7.2	Stimulation via BZR und TLR9 unter Einfluss von IFN- $\gamma$ und IL-21 .....	33
2.8	Statistische Auswertungen .....	35
2.8.1	t-Test und Mann-Whitney-U-Test .....	35
2.8.2	Varianzanalyse von mehr als zwei Stichproben .....	36
2.8.3	Korrelationsanalyse .....	36
2.8.4	Hauptkomponentenanalyse .....	37
2.8.5	Hierarchische Clusteranalyse .....	37
2.8.6	T-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE).....	38
2.8.7	Signifikanz.....	38
2.9	Materialien und Geräte .....	39
2.9.1	Reagenzien.....	39

2.9.2	Antikörper.....	39
2.9.3	Materialien .....	41
2.9.4	Geräte .....	41
2.9.5	Software .....	42
3	Ergebnisse.....	43
3.1	Zytokinmuster von T-Helfer-Zellen in Gelenken von JIA-Patienten.....	43
3.1.1	IL-21 produzierende CD4+ T-Helfer-Zellen akkumulieren in Gelenken von JIA-Patienten.....	43
3.1.2	Dichotome Expression von IL-21 und IL-17 in T-Helferzellen der Synovialflüssigkeit.....	46
3.1.3	IL-21+ T-Helferzellen akkumulieren bevorzugt in Gelenken von ANA+ JIA-Patienten .....	49
3.2	Expression von PD-1 charakterisiert eine Subpopulation von Gedächtnis-T-Zellen in der Synovialflüssigkeit von JIA-Patienten .....	52
3.2.1	Verteilung von PD1 <sup>hi</sup> CD4+ innerhalb der T-Zell-Subklassen.....	53
3.2.2	PD-1 <sup>hi</sup> CD4+ der Synovialflüssigkeit zeichnen sich durch Koexpression von IL-21 und INF- $\gamma$ aus .....	53
3.3	Phänotypischer Vergleich PD-1 <sup>hi</sup> T <sub>PH</sub> der Synovialflüssigkeit und T <sub>FH</sub> der Tonsille	57
3.4	Expansion von PD-1 <sup>hi</sup> HLA-DR+ T-Zellen vermehrt bei ANA+ JIA-Patienten ...	59
3.5	Funktionelle Analyse von PD-1 <sup>hi</sup> T <sub>PH</sub> der Synovialflüssigkeit und T <sub>FH</sub> .....	61
3.5.1	T <sub>PH</sub> und T <sub>FH</sub> leisten B-Zell-Hilfe und induzieren Plasmazellen .....	61
3.5.2	Vermehrte Induktion atypischer CD21 <sup>lo/-</sup> T-bet+CD11c+ B-Zellen durch PD-1 <sup>hi</sup> T <sub>PH</sub> der Synovialflüssigkeit ist abhängig von IL-21 und INF- $\gamma$ .....	63
3.6	Atypische CD21 <sup>lo/-</sup> T-bet+CD11c+ B-Gedächtniszellen in ANA+ JIA-Patienten	66
4	Diskussion .....	71

4.1	Polarisierung und Zytokinprofil .....	71
4.2	Differenzierung und Aktivierung .....	74
4.3	Chemokinrezeptormuster .....	75
4.4	Transkriptionsfaktoren .....	75
4.5	Funktion .....	76
4.6	Limitationen.....	79
5	Zusammenfassung.....	81
6	Literaturverzeichnis .....	82
	Appendix.....	
I	Abkürzungsverzeichnis .....	
II	Abbildungsverzeichnis .....	
III	Tabellenverzeichnis .....	
IV	Danksagung .....	
V	Lebenslauf.....	
VI	Eigene Veröffentlichungen und Kongressteilnahme.....	

# 1 Einleitung

## 1.1 Juvenile Idiopathische Arthritis

### 1.1.1 Klinische Manifestation und Klassifikation

Die Juvenile Idiopathische Arthritis (JIA) ist eine chronisch-inflammatorische Erkrankung vorwiegend der Gelenke und nach aktuellen Kriterien der International League of Associations for Rheumatology (ILAR) definiert durch einen Krankheitsbeginn vor dem Alter von 16 Jahren und einer Dauer von 6 Wochen ohne bekannte Ursache (1). Sie ist mit einer geschätzten Inzidenz von 3,2–26/100000/Jahr in Europa die häufigste rheumatische Erkrankung des Kindes- und Jugendalters (2-4). Allerdings handelt es sich bei der JIA nicht um ein homogenes Krankheitsbild, vielmehr lassen sich gemäß der ILAR-Klassifikation sieben Krankheitsentitäten anhand klinischer und serologischer Kriterien unterscheiden (5).

Die systemische Arthritis ist eine seltenere, aber gut abgegrenzte Unterform der JIA und weist große Ähnlichkeit mit dem adulten Still-Syndrom auf. Gekennzeichnet ist sie durch Arthritis mit simultan auftretenden oder vorausgehenden täglichen Fieberschüben. Zusätzlich treten ein flüchtiges, lachsfarbenes Exanthem, generalisierte Lymphknotenschwellungen, Hepato-/Splenomegalie, sowie Serositis auf (5). Im Gegensatz zu den meisten rheumatischen Erkrankungen des Kindesalters tritt sie gleich häufig bei Mädchen und Jungen auf und die Erkrankung kann bereits im ersten Lebensjahr beginnen. Diese Merkmale sind eher bei autoinflammatorischen Erkrankungen als bei Autoimmunerkrankungen zu sehen (6). Während in der Pathogenese autoimmuner bzw. rheumatischer Erkrankungen klonal expandierte T-Zellen, Autoantigene, antigenpräsentierende Zellen sowie teilweise Autoantikörper eine Rolle spielen, kommt es bei autoinflammatorischen Erkrankungen unabhängig von Antigenen zu einer überschießenden Inflammation aufgrund fehlerhafter Selbstregulationsmechanismen des Immunsystems. Die Grenze zwischen Autoimmunität und Autoinflammation ist jedoch nicht ganz scharf zu ziehen (7). Bei der systemischen Arthritis wurde beispielsweise bislang kein eindeutiger Zusammenhang mit autoreaktiven T-Zellen oder Autoantigenen festgestellt, was zu der



Annahme führen könnte, dass auch humane Leukozytenantigen-Moleküle (HLA) keine Rolle in der Pathogenese spielen (6). Dennoch konnten Ombrello et al. eine starke Assoziation der sJIA mit einem spezifischen HLA-Klasse-II-Gen, *HLA-DR1\*11* finden (8). Die Beteiligung von HLA Klasse II als antigenpräsentierendem Molekül könnte bedeuten, dass auch autoreaktive T-Zellen in der Pathogenese der sJIA eine Rolle spielen (6). Diskutiert wird die Hypothese eines biphasischen Verlaufs der sJIA, in welchem die abernante Produktion von IL-1 sekundär zu einer pathologischen T-Zell-Aktivierung führen kann, welche an der Aufrechterhaltung einer chronischen Arthritis beteiligt sein könnte (9). Eine schwere und potenziell tödliche Komplikation der sJIA ist das sogenannte Makrophagenaktivierungssyndrom (MAS), bei dem es zu einer unkontrollierten, überschießenden Inflammationsreaktion mit massiver Sekretion proinflammatorischer Zytokine kommt. Klinische Charakteristika sind hohes, persistierendes Fieber, Hepatosplenomegalie, generalisierte Lymphadenopathie und zentralnervöse Fehlfunktionen; laborchemisch bestehen insbesondere stark erhöhte Ferritin-Werte, erhöhte Transaminasen- und Triglycerid-Level sowie eine Panzytopenie und erniedrigte Fibrinogen-Werte (10).

Die Oligoarthritis stellt in Europa die häufigste Subgruppe dar (11). Sie ist definiert durch eine Arthritis von 1-4 Gelenken innerhalb der ersten 6 Krankheitsmonate. Bleibt die Erkrankung auch nach diesen 6 Monaten auf 4 oder weniger Gelenke beschränkt, spricht man von ‚persistent‘ Oligoarthritis, sind mehr Gelenke im weiteren Verlauf betroffen, von ‚extended‘ Oligoarthritis (5). Charakteristischerweise handelt es sich um einen asymmetrischen Gelenkbefall, wobei häufig die großen Gelenke der unteren Extremität betroffen sind (11). Die Uveitis ist die häufigste extraartikuläre Manifestation der Erkrankung und scheint insbesondere mit einem jüngeren Erkrankungsalter (< 6 Jahre) und Vorhandensein von Antinukleären Antikörpern (ANA) assoziiert zu sein (12).

Sind schon innerhalb der ersten 6 Monate mehr als 4 Gelenke betroffen, wird von Polyarthritiden gesprochen, welche wiederum in eine Rheumafaktor (RF)-negative und -positive Form unterteilt werden kann (5). Die Rheumafaktor-positive (RF+) Polyarthritiden ist von allen JIA-Entitäten am ehesten vergleichbar mit der adulten Form der seropositiven rheumatoiden Arthritis und ist die einzige JIA-Form, in der Antikörper gegen zyklisches

citruilliniertes Peptid (CCP) gefunden werden konnten (13). Die Rheumafaktor-negative (RF-) Form ist hingegen eine heterogenere Erkrankungsform, innerhalb derer wiederum drei verschiedene Erscheinungsformen beobachtet werden können. Eine ähnelt in ihrem symmetrischen Befallsmuster kleiner und großer Gelenke der adulten RF-negativen rheumatoiden Arthritis, hat einen späteren Erkrankungsbeginn und ist typischerweise ANA-negativ. Der zweite, häufig ANA-positive Phänotyp mit einem früheren Erkrankungsbeginn ähnelt der Oligoarthritis. Bei der dritten Form handelt es sich um die sogenannte „trockene Synovitis“, bei der eine ausgeprägte Gelenksteifigkeit und Kontrakturen und weniger Gelenkschwellungen im Vordergrund stehen und die schlecht auf medikamentöse Therapie anspricht (1, 11).

Die Enthesitis-assoziierte Arthritis (EAA) ist gemäß ILAR-Klassifikation charakterisiert durch Arthritis in Verbindung mit Enthesitis, einer schmerzhaften Entzündung der Ansätze von Sehnen, Ligamenten, Faszien und Gelenkkapseln am Knochen (5, 14). Sie betrifft typischerweise Jungen ab dem Alter von 6 Jahren, von denen der überwiegende Teil positiv für das HLA-B27-Antigen ist (11). Auch iliosakrale oder entzündliche lumbosakrale Schmerzen, sowie Uveitis dienen der Diagnosestellung (5).

Arthritis in Verbindung mit Psoriasis wird nach der ILAR-Klassifikation als einzelne Subgruppe unter der Bezeichnung Psoriasisarthritis (PsA) zusammengefasst. Die Diagnose kann auch ohne charakteristische psoriatische Hauterscheinungen gestellt werden, falls zusätzlich zwei der folgenden Merkmale erfüllt werden: Daktylitis, Tüpfelnägel oder Onycholyse oder bekannte Psoriasis eines erstgradigen Verwandten (5). Dennoch kann die Arthritis einer Psoriasis um Jahre vorausgehen, wodurch die Diagnose unter Umständen verzögert wird (15). Es gibt darüber hinaus Hinweise, dass auch innerhalb dieser heterogenen Patientengruppe zwei Erkrankungsformen anhand ihres Altersgipfels, dem Auftreten von Daktylitis und ANA-Positivität unterschieden werden können: Eine ähnelt in ihrem jungen Erkrankungsalter und der hohen Rate ANA-positiver Patienten und Uveitis der ANA-positiven Oligo- oder Polyarthritis, die andere ist assoziiert mit HLA-B27,

zeigt sich häufiger in Begleitung von Enthesitis und Daktylitis und mit axialem Befallsmuster und kann somit am ehesten – wie auch die EAA und die Psoriasisarthritis des Erwachsenen – dem Spektrum der Spondylarthropathien zugeordnet werden (14, 15).

Die letzte JIA-Kategorie ist die undifferenzierte Arthritis. In diese fallen Patienten, die entweder die Kriterien für keine oder mehrere der oben beschriebenen Untergruppen erfüllen (5). Da die Klassifikation durch wechselseitigen Ausschluss definiert ist, würde beispielsweise ein Patient mit Psoriasis und Arthritis, der zusätzlich Zeichen von Enthesitis zeigt und HLA-B27-positiv ist als undefinierte Arthritis klassifiziert, da er die Kriterien für EAA und Psoriasisarthritis erfüllt.

Systemische Arthritis, EAA und RF+ Polyarthritiden beschreiben also relativ homogene Krankheitsbilder, die sich mit Erkrankungen des Erwachsenenalters, dem adulten M. Still, den Spondylarthritiden und der RF+ rheumatoiden Arthritis vergleichen lassen. Bei Oligoarthritiden, RF- Polyarthritiden, Psoriasisarthritis und undifferenzierter Arthritis handelt es sich dagegen wahrscheinlich eher um heterogene Patientengruppen und besonders die Anzahl der betroffenen Gelenke und Psoriasis werden als Klassifikationskriterien kontrovers diskutiert (1).

### **1.1.2 Antinukleäre Antikörper definieren eine klinisch homogene JIA-Subgruppe**

Obwohl bei der JIA bereits verschiedenste Autoantikörper, unter anderem RF, anti-CCP Antikörper und ANA mit erhöhter Prävalenz nachgewiesen wurden, ist deren diagnostischer Stellenwert bei der JIA im Vergleich zu anderen Autoimmunerkrankungen bisher begrenzt. Während RF und anti-CCP Antikörper spezifisch für die RF+ Polyarthritiden zu sein scheinen, können ANA besonders in der Oligoarthritiden-Gruppe, aber auch bei der RF- Polyarthritiden, Psoriasisarthritis und undifferenzierter Arthritis beobachtet werden (13, 16). Ergebnisse einer Studie mit 971 JIA-PatientInnen konnten zeigen, dass ANA-positive PatientInnen innerhalb dieser JIA-Kategorien eine homogene Subgruppe bilden, die sich durch einen früheren Erkrankungsbeginn, vorwiegend weibliches Geschlecht, asymmetrischen Gelenkbefall und hohes Risiko für das Auftreten von Uveitis auszeichnet (17, 18). Insbesondere in dieser Gruppe kann eine Uveitis anfangs asymptomatisch

sein, sodass bei positivem ANA-Titer besonderes Augenmerk auf konsequente Vorsorgeuntersuchungen und frühzeitige Therapie gelegt werden sollte, um Komplikationen – im schlimmsten Fall permanenten Visusverlust – zu verhindern (12). Genexpressionsanalysen zeigten zudem, dass Oligo- und RF- Polyarthritispatienten mit einem frühen Krankheitsbeginn vor dem Alter von 6 Jahren eine charakteristische B-Zell-Signatur aufweisen, unabhängig von der Zahl der betroffenen Gelenke (19). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei Oligoarthritis und RF- Polyarthritis mit frühem Krankheitsbeginn um die gleiche Erkrankung handelt. Die Wertigkeit neuer Klassifikationskriterien für die JIA, die unter anderem ANA+ PatientInnen mit frühem Krankheitsbeginn unabhängig von der Anzahl der betroffenen Gelenke unter eine Subgruppe zusammenführen, wird momentan untersucht (20). Es stellt sich zudem die Frage, ob dieser ANA+ Form der JIA mit frühem Krankheitsbeginn neben einer phänotypischen Eigenständigkeit auch eine spezifische Pathogenese zugrunde liegt. Bislang konnten jedoch keine spezifischen Zielantigene der ANA bei der JIA identifiziert werden.

## **1.2 Die Zellen des adaptiven Immunsystems**

Im Kontext von Autoimmunerkrankungen sind besonders die Zellen des erworbenen bzw. adaptiven Immunsystems, die T- und B-Zellen bedeutsam. Die Mechanismen zur Generierung antigenspezifischer Rezeptoren und zur Differenzierung zwischen „Selbst“ und „Fremd“ unterscheiden sich grundlegend zwischen dem angeborenen und adaptiven Teil des Immunsystems. Während die Zellen des angeborenen Immunsystems (Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen, natürliche Killerzellen, Mastzellen) pathogenassoziierte Muster (pathogen associated patterns, PAMPs) mithilfe einer begrenzten Zahl von nicht-varianten Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors, PRP) erfassen, zeichnen sich T- und B-Zellen zusätzlich durch in ihrer Spezifität hochvariable Rezeptoren für die Erkennung von Antigenen aus. Die Generierung dieser hohen Variabilität der B- und T-Zell-Rezeptoren wird dabei durch eine somatische Rekombination von Gensegmenten bewerkstelligt (V-, D-, J-Rekombination). Bei Kontakt mit dem passenden Antigen werden naive T- oder B-Zellen aktiviert, proliferieren und differenzieren sich in verschiedene Typen von Effektorzellen. Einige der aktivierten T-

oder B-Zellen entwickeln sich dabei zu Gedächtniszellen, welche beim wiederholten Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen schnell erneut zu Effektorzellen differenzieren können und so für eine langanhaltende Immunität gegenüber pathogenen Erregern sorgen. Diese wichtige Fähigkeit des adaptiven Immunsystems wird als immunologisches Gedächtnis bezeichnet (21). Die Grenzen zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem verschwimmen jedoch zunehmend und die Fähigkeit zur Bildung eines immunologischen Gedächtnisses gilt nicht mehr als exklusives Merkmal des adaptiven Immunsystems. Auch die Zellen des angeborenen Immunsystems können als Reaktion auf exogene oder endogene Stimuli funktional reprogrammiert werden und so die Immunantwort beim zweiten Kontakt verändert werden. Diese Form des immunologischen Gedächtnisses wird „trained immunity“ (trainierte angeborene Immunität) genannt (22).

### **1.2.1 B-Zellen**

B-Zellen sind die wichtigsten Vertreter der sogenannten humoralen Immunantwort. Die von ihnen sezernierten Antikörper (Immunglobuline) können Pathogene und bakterielle Toxine neutralisieren und so deren Eindringen in Zellen verhindern. Darüber hinaus dienen Antikörper der Opsonierung von Krankheitserregern. Ist die Oberfläche eines Pathogens mit Antikörpern besetzt, können Phagozyten mit Fc-Rezeptoren an den konstanten Teil des Antikörpers (die Fc-Region) binden und das Pathogen phagozytieren. Durch zusätzliche Komplementaktivierung durch Antikörper kann dieser Vorgang unterstützt werden (21). Der B-Zell-Rezeptor (engl. B cell receptor, BCR) ist die membrangebundene Form des spezifischen Immunglobulins, welches B-Zellen nach ihrer Differenzierung in Plasmazellen sezernieren können. Durch die sogenannte somatische Rekombination, bei der Genabschnitte des BCR zufallsgesteuert rearrangiert werden, wird eine extreme Variabilität an BCR-Spezifitäten erreicht, der Preis ist jedoch ein initial hoher Anteil autoreaktiver, also gegen körpereigene Antigene gerichteter BCR (21). Deshalb durchlaufen B-Zellen während ihrer Differenzierung verschiedene Mechanismen der sogenannten zentralen und peripheren Toleranz, die autoreaktive B-Zellen an der weiteren Entwicklung hindern sollen (23). Ein Versagen dieser Mechanismen kann zur Aktivierung autoreaktiver B-Zellen und damit zu Autoimmunphänomenen führen.

### 1.2.2 Differenzierung von B-Zellen

Alle großen Populationen menschlicher peripherer B-Zellen können anhand ihrer Expression von CD19 (engl. cluster of differentiation 19), CD20, IgD, CD27, CD38 und CD24 charakterisiert werden. Mit Hilfe dieser Marker können Transitionalzellen, reife naive B-Zellen, B-Gedächtniszellen und Antikörper sezernierende Zellen unterschieden werden (24). Das kostimulatorische Molekül CD19 wird dabei (mit Ausnahme einer kleinen Gruppe langlebiger Plasmazellen) von allen B-Zellen exprimiert und wird daher oft zur Selektion der gesamten peripheren B-Zell-Population herangezogen (25).

Unreife Zellen, welche aus dem Knochenmark in die Peripherie entlassen werden, werden als Transitional-B-Zellen bezeichnet (23). Ihr Phänotyp lässt sich beschreiben als CD19+IgD<sup>lo/+</sup>CD27-CD24++CD38++ (24). Während ihrer weiteren Differenzierung durchlaufen sie die Entwicklungsstadien T1, T2 und T3, welche sich durch ihre Relation von CD24, CD38, CD10, CD9 und IgD/IgM unterscheiden lassen (24, 26). Im Anschluss entstehen reife, naive CD19+CD27-IgD+ B-Zellen mit Herabregulation von CD24 und CD38 (24). Der Großteil der naiven B-Zellen exprimiert gleichzeitig IgD und IgM, eine Herabregulation von IgM kann jedoch bei BCR-Stimulation auftreten, sodass beispielsweise IgM<sup>lo</sup> B-Zellen, die Kontakt zu Autoantigenen hatten, in geringem Maße bei gesunden Individuen und vermehrt in Autoimmunerkrankungen feststellbar sind (24, 27).

Im Rahmen der humoralen Immunantwort wird durch Antigenkontakt die Differenzierung reifer, naiver B-Zellen in B-Gedächtniszellen und Plasmazellen ausgelöst. Neben der Antigenbindung an den BCR und Aktivierung der kostimulatorischen Moleküle CD19, CD21 und CD81 wird dazu meist die Hilfe antigenspezifischer T-Helferzellen benötigt. Binden diese mit ihrem TCR ihr spezifisches Antigen, welches ihnen mittels MHC-II-Molekül von der B-Zelle präsentiert wird, regen sie mittels CD40-Liganden und weiterer kostimulatorischer Moleküle sowie Zytokinsekretion das Überleben und die weitere Differenzierung der B-Zelle an. Im Gegenzug wird die T-Zelle durch Induktion der Transkriptionsfaktoren Bcl-6 und c-Maf via ICOS (inducible costimulator) zur weiteren Differenzierung angeregt. Während der Proliferation entstehen in den Keimzentren sekundärer

Lymphfollikel B-Zell-Klone, deren BCR durch somatische Hypermutation geringfügig verändert wurden. Genauer gesagt werden einzelne Basenpaare in den Genen der V-Region des BCR durch das Enzym aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase ausgetauscht. Aus diesen eng verwandten B-Zell-Klonen werden während der Affinitätsreifung anschließend diejenigen Klone selektiert, welche die höchste Affinität zu ihrem Antigen aufweisen (21). Hierbei spielen auch polyreaktive B-Zell-Klone, welche unter anderem auch gegen körpereigene Antigene gerichtet sind, eine wichtige Rolle. Anstatt aussortiert zu werden, werden sie in einem anergen Zustand gehalten und bieten einen wichtigen Schutzmechanismus gegen Pathogene, welche Selbst-Antigene imitieren (28, 29). Bei Antigenkontakt können sie in Keimzentren migrieren und zu einer höheren Bindungsaffinität gegenüber dem pathogenen Antigen gelangen, was als „clonal redemption“ bezeichnet wird (29).

Somatisch hypermutierte B-Zellen werden als B-Gedächtniszellen bezeichnet und durch die Expression von CD27 charakterisiert (30). Während naive B-Zellen nur eine Lebensdauer einiger Wochen besitzen, können Gedächtniszellen jahrzehntelang überleben und bei Stimulation schneller und effizienter proliferieren und differenzieren als naive B-Zellen (31-33). Weiterhin können B-Gedächtniszellen danach beurteilt werden, ob sie einen Immunglobulin-Klassenwechsel von IgD bzw. IgM hin zu IgG, IgA oder IgE durchlaufen haben. Es werden also IgM+IgD+CD27+ nicht-klassengewechselte (non-switched memory, NSM) von IgM-IgD-CD27+ klassengewechselten (switched memory, SM) B-Gedächtniszellen unterschieden (30).

Zu den Antikörper sezernierenden Zellen gehören Plasmablasten und Plasmazellen. Bei Plasmablasten handelt es sich um proliferierende Zellen unterschiedlichen Differenzierungsgrades. Plasmazellen hingegen gehören zu den ruhenden, reifen Gedächtniszellen (24). Im Blut zirkulierende, antikörpersezernierende Zellen zeichnen sich durch hohe Expression von CD38 und CD27 sowie fehlende Expression von IgD, CD20 (mit Ausnahme von CD20+ Pre-Plasmablasten) und CD24 aus (24).

Regulatorische B-Zellen ( $B_{reg}$ ) besitzen die Fähigkeit proinflammatorische Monozyten und T-Zellen zu hemmen und tragen so zum Erhalt des immunologischen Gleichgewichts

bei (34). Regulatorische Funktion konnte innerhalb verschiedener B-Zell-Populationen festgestellt werden und ist nicht mit der Expression charakteristischer Oberflächenmarker verknüpft, sodass  $B_{reg}$  am besten durch ihr Zytokinprofil, insbesondere IL-10 zu identifizieren sind (24, 34).

Eine kleine periphere B-Zell-Population des Menschen exprimiert kein CD27, obwohl sie einen Immunglobulin-Klassenwechsel durchlaufen hat, wie durch ihren Verlust von IgD und teils auch IgM erkennbar ist. Diese CD27-IgD<sup>-</sup> B-Zellen werden als doppelt-negative (DN) B-Zellen oder als atypische B-Gedächtniszellen (atypical memory B cells, aMBC) bezeichnet (24). Bei Gesunden bildet diese Population einen Anteil von < 10 % aller CD19<sup>+</sup> Zellen des Blutes, dieser kann jedoch beispielsweise bei Patienten mit systemischem Lupus erythematodes (SLE) bis auf 40 % steigen (25). DN B-Zellen können weiter unterteilt werden in CXCR5<sup>-</sup>CD21<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup> DN1 und CXCR5<sup>+</sup>CD21<sup>lo</sup>CD11c<sup>+</sup> DN2 (25, 35). Bei DN1 handelt es sich vermutlich um früh aktivierte B-Gedächtniszellen, wohingegen DN2 Vorgänger antikörperproduzierender Zellen zu sein scheinen, welche aus neu aktivierten, naiven B-Zellen durch extrafollikuläre Differenzierung entstanden sind (24, 25). Der Begriff „atypische Gedächtniszelle“ ist daher unter Umständen irreführend, da es sich zumindest bei DN2 eigentlich nicht um Gedächtniszellen handelt (24).

In einer wachsenden Zahl chronischer Infektions-, Autoimmun- und Autoinflammationserkrankungen des Menschen konnte eine Expansion aktivierter und/oder atypischer B-Gedächtniszellen beobachtet werden (25, 35-41). Der Phänotyp dieser Populationen ist heterogen, allerdings war im Gegensatz zu klassischen B-Gedächtniszellen häufig eine niedrige Expression von CD21, CD23 und CD27, sowie die Expression von CD11c und des Transkriptionsfaktors T-bet (T-box expressed in T cells) zu beobachten (40, 42). Phänotypische Überlappungen bestehen einerseits zu den oben beschriebenen DN2 B-Zellen, andererseits zu sogenannten altersassoziierten B-Zellen (age-associated B cells, ABC), welche initial in alternden Mäusen sowie in SLE-Mausmodellen beschrieben wurden. Als phänotypische Kriterien dieser ABC wurden ebenfalls eine fehlende Expression von CD21 und CD23 sowie die Expression von CD11c definiert (43, 44). Die Expression von



CD11c und Herabregulation von CD21 wird maßgeblich reguliert durch den Transkriptionsfaktor T-bet, welcher in Mäusen als Folge von Stimulation via BCR und Toll-like Receptor (TLR) 7 in Verbindung mit IL-21 und IFN- $\gamma$  induziert zu werden scheint (45, 46). Ein CD21<sup>lo</sup>/T-bet<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> Phänotyp kann jedoch in verschiedenen B-Zell-Populationen durch TLR7-Stimulation in Anwesenheit von IFN- $\gamma$ - und IL-21 induziert werden, sodass diese Marker allein vermutlich eher für einen aktivierten Status der B-Zellen als für eine spezifische B-Zellpopulation stehen (24, 47). Die zusätzliche Bestimmung von CD27, IgD bzw. IgM erscheint daher ratsam zur Identifizierung „atypischer B-Gedächtniszellen“ bzw. DN2 B-Zellen (24). Bei Menschen wird T-bet in B-Zellen besonders durch BCR- und TLR7-Signal in Verbindung mit IFN- $\gamma$  induziert und die IL-21-abhängige Differenzierung in Antikörper-sezernierende Zellen wird durch TLR-Stimulation und IFN- $\gamma$  verstärkt (48-50). Diese Erkenntnisse legen nahe, dass T-Helferzellen, durch Stimulation via BCR, IFN- $\gamma$  und IL-21, in Verbindung mit TLR7-Signal, die entscheidende Rolle bei der Entstehung von CD21<sup>lo</sup>T-bet<sup>hi</sup> B-Zellen spielen (25, 49-51).

### **1.2.3 Die Rolle von B-Zellen in der Pathogenese der JIA**

Das Auftreten von Autoantikörpern in bestimmten Subgruppen der JIA deutet darauf hin, dass autoreaktive B-Zellen eine bisher unvollständig aufgeklärte Rolle in der Pathogenese der JIA spielen (52, 53). Im peripheren Blut von Oligo- und Polyarthritispatienten wurde eine Expansion klassengewechselter B-Gedächtniszellen festgestellt, welche besonders bei Patienten mit frühem Erkrankungsbeginn stärker ausgeprägt war (54). In der Synovialflüssigkeit konnte ebenfalls eine Akkumulation klassengewechselter B-Gedächtniszellen beobachtet werden, darunter auch antinukleäre B-Zellen (52, 54, 55). Unter den IgM-IgD- klassengewechselten B-Zellen waren auch CD27- DN B-Zellen (52). Die Gedächtniszellen der Synovialflüssigkeit scheinen unabhängig von der Produktion von Autoantikörpern auch eine Funktion als antigenpräsentierende Zellen zu haben und dadurch eine Rolle bei der pathologischen Aktivierung von T-Zellen zu spielen (52).

#### **1.2.4 T-Zellen**

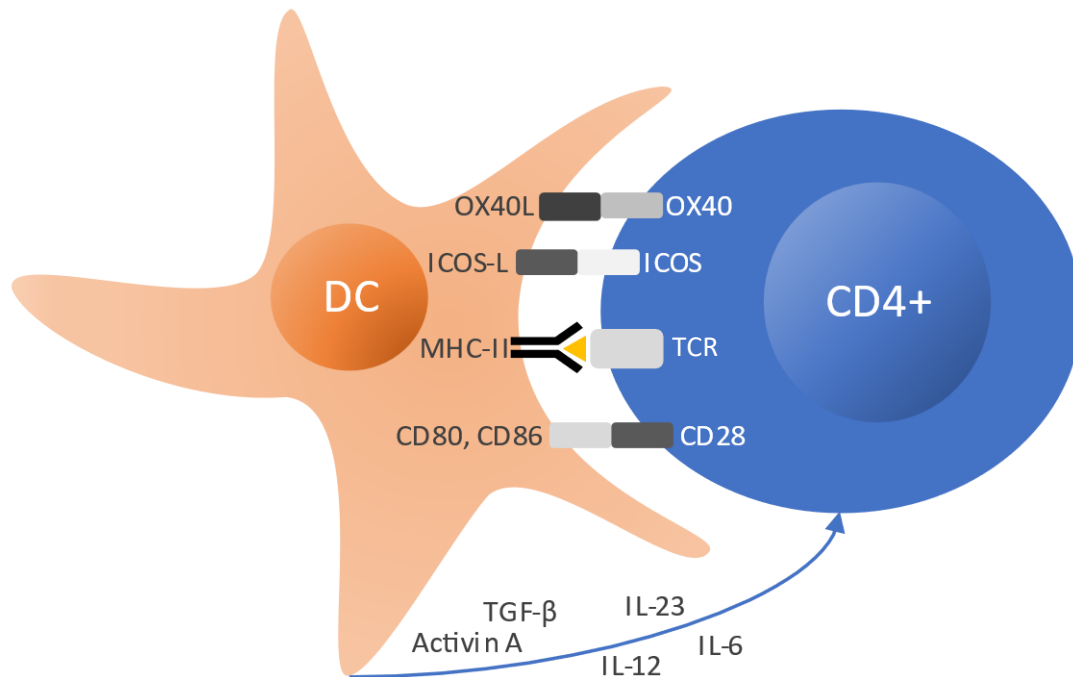
Eine essenzielle Rolle in der Funktion des adaptiven Immunsystems spielen T-Zellen. Sie werden als Vorläuferzellen im Knochenmark gebildet und wandern von dort in den Thymus, wo sie durch NOTCH-Rezeptor-Signale auf die T-Zell-Linie festgelegt werden und sich bereits früh in zwei Entwicklungslinien, die  $\alpha:\beta$ - und die  $\gamma:\delta$ -Linie aufteilen. Die sich dort entwickelnden, unreifen Lymphozyten werden auch Thymozyten genannt. Analog zur B-Zell-Entwicklung entsteht der spezifische T-Zell-Rezeptor (engl. T cell receptor, TCR) durch Genumlagerungen, beginnend mit den Genen der  $\beta$ -Kette. Sind diese beendet und beginnt die Umlagerung der Gene für die  $\alpha$ -Kette, werden parallel die Ko-Rezeptoren CD4 und CD8 exprimiert. Während der weiteren Entwicklung müssen Mechanismen der sogenannten positiven und negativen Selektion durchlaufen werden. Einerseits empfangen nur diejenigen Thymozyten Überlebenssignale, welche körpereigene Peptid-MHC-Komplexe binden können (positive Selektion), andererseits führt eine zu starke Reaktion auf Selbst-Peptid:Selbst-MHC-Komplexe zur Apoptose, sodass potenziell autoreaktive T-Zellen beseitigt werden. Diesen Prozess überleben nur ca. 2 % der Zellen. Thymozyten mit MHC-I-spezifischen Rezeptoren entwickeln sich dabei zu CD8+ zytotoxischen T-Zellen (CTL), während Thymozyten mit MHC-II-spezifischen Rezeptoren ihre CD8-Expression verlieren und sich zu CD4+ T-Helferzellen entwickeln (21).

#### **1.2.5 Die antigenabhängige T-Zell-Aktivierung**

Nachdem die Entwicklung der T-Zellen im Thymus abgeschlossen ist, werden sie als reife, naive T-Zellen in das periphere Blut entlassen und rezirkulieren von dort in die sekundären lymphatischen Organe bis zum Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen, welches ihnen mittels MHC-Moleküls präsentiert werden muss. Während beinahe alle kernhaltigen Zellen MHC-I-Moleküle besitzen, befinden sich die für die Antigenpräsentation gegenüber CD4+ T-Zellen notwendigen MHC-II-Moleküle nur auf spezialisierten antigenpräsentierenden Zellen (APC). Deren wichtigste Vertreter sind dendritische Zellen, daneben können jedoch auch Makrophagen und B-Zellen eine antigenpräsentierende Funktion übernehmen (21).

Für die Aktivierung naiver T-Zellen sind drei Arten von Signalen notwendig (Abbildung 1). Das erste Aktivierungssignal ist der Antigenkontakt selbst. Dieser findet durch Bindung des Peptid-MHC-Komplexes auf der APC mithilfe des TCR und der Korezeptoren CD4 oder CD8 auf der T-Zelle statt. Die zweite Art von Signalen erhalten T-Zellen von APC über kostimulatorische Moleküle. Hierdurch wird das weitere Überleben der Zelle während der Aktivierung ermöglicht. Zu den kostimulatorischen Molekülen auf T-Zellen gehören beispielsweise CD28, ICOS, OX40 oder der CD40-Ligand. Kostimulatorische Moleküle werden von antigenpräsentierenden Zellen nicht konstitutiv, sondern nur nach vorheriger Aktivierung exprimiert. Dies ist bedeutsam, da auch körpereigene Antigene via MHC-Molekül präsentiert werden. Durch fehlende kostimulatorische Signale wird jedoch in der Regel verhindert, dass hierdurch autoreaktive T-Zellen aktiviert werden können. Problematisch sind allerdings mit bakteriellen Adjuvanzen gemischte körpereigene Antigene, da diese zur Aktivierung der antigenpräsentierenden Zelle und Expression kostimulatorischer Moleküle führen können. Das dritte Signal wird durch Zytokine übermittelt und bestimmt den weiteren Differenzierungsweg der T-Zelle. Durch Stimulation über diese drei Signalwege gemeinsam wird die klonale Expansion der T-Zelle ausgelöst. Dabei entsteht eine Vielzahl an T-Zellen mit identischer Antigenpezifität, welche sich anschließend in T-Effektorzellen und -Gedächtniszellen differenzieren. Die T-Effektorzellen können anschließend das sekundär-lymphatische Organ verlassen und an den Ort der Infektion migrieren (21).

Antigenerfahrene und naive T-Zellen können phänotypisch anhand von Unterformen der Thyrosinphosphatase CD45 unterschieden werden. Bei Antigenkontakt wird deren Isoform durch alternatives Spleißen von Exons von CD45RA zu CD45RO gewechselt. Naive T-Zellen exprimieren zudem den Chemokinrezeptor CCR7, der ihnen die Zirkulation in die T-Zell-Zonen der lymphatischen Gewebe ermöglicht. Während T-Effektorgedächtniszellen ( $T_{EM}$ ) die Expression von CCR7 verlieren, bleibt sie in den sogenannten zentralen T-Gedächtniszellen ( $T_{CM}$ ) erhalten und ermöglicht diesen so weiterhin die Rezirkulation zwischen Blut und sekundär-lymphatischen Organen (21).



**Abbildung 1: Antigenabhängige Aktivierung von T-Helferzellen durch antigenpräsentierende Zellen.** Durch die Bindung eines mittels MHC-II präsentierten Antigens durch den T-Zell-Rezeptor und durch Kostimulation via CD28 mittels CD80 und CD86 kommt es zur Aktivierung der T-Helferzelle. Dies ist Voraussetzung für die weitere Differenzierung der T-Zelle. Zusätzliche kostimulatorische Moleküle und das vorherrschende Zytokinmilieu bestimmen den weiteren Differenzierungsweg. Beispielfhaft dargestellt sind die kostimulatorischen Moleküle (ICOS und OX40) sowie Zytokine, die eine Differenzierung in folliculäre T-Helferzellen (TFH) induzieren (56). IL-12 ist das Zytokin mit der größten induzierenden Wirkung auf TFH-Moleküle wie IL-21, CXCR5, Bcl6, ICOS und c-Maf. TGF-β und Activin A bewirken synergistisch ebenfalls eine TFH-Differenzierung. IL-23 und IL-6 haben supportive Funktion (56). Grafik adaptiert von Ueno, 2016 (56).

### 1.2.6 Polarisierung von CD4+ T-Helferzellen

Während CD8+ CTL darauf spezialisiert sind, mit einem Pathogen infizierte Zellen zu erkennen und zerstören, regulieren CD4+ T-Helferzellen eher die Funktion anderer Zellarten. Diese vielfältige Helferfunktion wird durch Zytokine vermittelt, die in unterschiedlichen Mustern von funktionell definierten Subgruppen von CD4+ T-Helferzellen sezerniert werden. Abhängig von ihrer jeweiligen Funktion und insbesondere ihres Zytokinmusters werden diese in  $T_H1$ ,  $T_H2$ ,  $T_H17$ ,  $T_H9$ ,  $T_H22$ , regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ) oder folliculäre T-Helferzellen ( $T_{FH}$ ) unterteilt. Das Zytokinmilieu während der antigenabhängigen Aktivierung naiver T-Zellen vermittelt hierbei die Polarisierung und Funktion der späteren T-Effektorzelle (21).

T<sub>H</sub>1-Zellen sind proinflammatorische T-Zellen, die eine wichtige Rolle in der Immunität gegenüber intrazellulären Erregern spielen und sich unter anderem durch die Expression von Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) auszeichnen. Die Differenzierung in T<sub>H</sub>1 Zellen wird induziert durch IL-12, IFN- $\gamma$  und IL-2 und vermittelt unter anderem durch die Transkriptionsfaktoren T-bet und STAT4 (signal transducer and activator of transcription 4). Das Signatur-Zytokin von T<sub>H</sub>1-Zellen, IFN- $\gamma$ , trägt einen wichtigen Teil zur Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 1, Multiple Sklerose und rheumatoider Arthritis bei, indem es die Expression von Toll-like Rezeptoren in Zellen des angeborenen Immunsystems induziert, die Antigenpräsentation über MHC-Moleküle fördert und zu gesteigerter Zytokinsekretion und Makrophagenaktivierung führt (57).

T<sub>H</sub>2-Zellen sind besonders in epithelialen Geweben zu finden, wo sie an der Abwehr parasitärer Infektionen beteiligt sind. Sie werden charakterisiert über die Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13, sowie die Expression der Transkriptionsfaktoren GATA3 und STAT6. IL-4 fördert die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen und induziert Immunglobulin-Klassenwechsel zu IgG1 und IgE und ist hierdurch an der Pathogenese von Allergien und Asthma, aber auch Autoantikörper-vermittelter Erkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematodes beteiligt (21, 57).

T<sub>H</sub>17-Zellen werden durch IL-6, TGF- $\beta$ , IL-1 und IL-23, vermittelt durch die Transkriptionsfaktoren STAT3 und ROR $\gamma$ t (thymusspezifische Form des retinoic acid-related orphan receptor  $\gamma$ ), induziert und sind in ihrer physiologischen Funktion an der Bekämpfung extrazellulärer Bakterien und Pilze beteiligt. Durch Sekretion von IL-17 werden neutrophile Granulozyten rekrutiert, B-Zellen unterstützt und vermehrt proinflammatorische Zytokine freigesetzt, was T<sub>H</sub>17-Zellen zu wichtigen Vermittlern organspezifischer Autoimmunität macht. Andererseits können T<sub>H</sub>17-Zellen ebenso einen antiinflammatorischen Effekt durch die Induktion von IL-10-Sekretion haben (57).

Die Gegenspieler der proinflammatorischen T-Helferzellen sind regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>). Durch Unterdrückung der T-Zell-Antworten tragen sie dazu bei, die Immunantwort zu begrenzen und Autoimmunität entgegenzuwirken (21). Sie zeichnen sich durch die

Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 und TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ), sowie durch die Expression von CD25 und der Transkriptionsfaktoren FoxP3 und STAT5 aus (57, 58).

Follikuläre T-Helferzellen ( $T_{FH}$ ) sind spezialisiert darauf, B-Zellen bei der Differenzierung in B-Gedächtniszellen bzw. Plasmazellen Hilfe zu leisten und spielen eine entscheidende Rolle bei der Bildung von Keimzentren in sekundär-lymphatischen Organen. Sie zeichnen sich vor allem durch die Expression des Chemokinrezeptors CXCR5, welcher für die Lokalisation dieser Zellen in die T-B-Zell-Zone von B-Zell-Follikeln benötigt wird, sowie eine hohe Expression der immunmodulatorischen Rezeptoren PD-1 (programmed cell death protein 1) und ICOS aus (59). Bcl-6 (B cell CLL/lymphoma 6) ist der essenzielle Transkriptionsfaktor für die  $T_{FH}$ -Linie und wird unter anderem durch die von dendritischen Zellen sezernierten Zytokine TGF- $\beta$ , IL-12 und IL-23 induziert (60, 61). CXCL13, der Ligand von CXCR5, wird ebenfalls von  $T_{FH}$  exprimiert und rekrutiert CXCR5+ B-Zellen in die Follikel. IL-21 wird in großen Mengen von  $T_{FH}$ -Zellen gebildet, wobei PD-1 einen wichtigen Beitrag zur Produktion dieses Zytokins leistet (62). Daher steht IL-21 in enger Verbindung zu  $T_{FH}$  und wird häufig zur Charakterisierung dieser Zellpopulation mit herangezogen, die Expression von IL-21 ist jedoch nicht auf  $T_{FH}$  beschränkt, sondern konnte auch in NK-Zellen,  $T_H1$ ,  $T_H2$  und  $T_H17$  gezeigt werden (63). IL-21 ist mitverantwortlich für die Keimzentrumsentwicklung und bewirkt B-Zell-Proliferation (59). Insbesondere induziert es jedoch die Expression des Transkriptionsfaktors Blimp-1 in B-Zellen und bewirkt somit die Differenzierung zu Plasmazellen (64, 65). Diverse Arbeiten schreiben IL-21 zudem einen autokrinen Effekt auf das Überleben von  $T_{FH}$  zu, kommen jedoch zu uneinheitlichen Ergebnissen in Bezug auf das Ausmaß dieses Effekts (63). In aktuellen Differenzierungsmodellen wird zwischen Keimzentrums- $T_{FH}$  (engl. germinal center  $T_{FH}$ , GC- $T_{FH}$ ) und  $T_{FH}$  außerhalb von Keimzentren (non-GC- $T_{FH}$  oder nur  $T_{FH}$ ) differenziert. GC- $T_{FH}$  weisen den ausgeprägtesten  $T_{FH}$ -Phänotyp mit hoher Expression von CXCR5, ICOS, PD-1 und Bcl-6 auf und unterscheiden sich auch in ihrem Zytokinprofil durch die ausgeprägteste IL-21-Expression in Verbindung mit reduzierter IL-17- und IFN- $\gamma$ -Expression von non-GC- $T_{FH}$  (59).

### 1.2.7 CD4+ T-Helferzellen in den Gelenken von JIA-Patienten

Auch in der Oligo-JIA haben  $T_{reg}$  der SF vermutlich einen begrenzenden oder sogar rückbildenden Einfluss auf das Inflammationsgeschehen. Eine Expansion von CD4+CD25+  $T_{reg}$  in der SF von Oligoarthritiden-Patienten scheint mit einem günstigeren Krankheitsverlauf assoziiert zu sein (58).

Den größten Anteil der  $T_H$ -Zellen der Synovialflüssigkeit bilden  $T_H1$ -Zellen. Weitaus seltener sind hingegen  $T_H17$ -Zellen. Dennoch wird ihnen zunehmende Bedeutung in der Pathogenese der JIA beigemessen. In Patienten mit aktiver JIA lassen sich in der Synovialflüssigkeit erhöhte Zahlen von  $T_H17$ -Zellen und erhöhte Konzentrationen von IL-17A nachweisen (66-68).

In diversen chronisch-inflammatorischen Erkrankungen konnten  $T_H17$ -Zellen beobachtet werden, welche sich in Richtung eines  $T_H1$ -Phänotyps entwickelt hatten (69). Auch in der JIA exprimiert ein Teil der  $T_H17$ -Zellen der Synovialflüssigkeit zusätzlich zu IL-17 das  $T_H1$ -Signaturzytokin IFN- $\gamma$ . *In vitro* konnte gezeigt werden, dass sich  $T_H17$ -Zellen der Synovialflüssigkeit von JIA-Patienten unter dem Einfluss von IL-12 und TNF- $\alpha$  in Richtung eines  $T_H1$ -Phänotyps entwickeln und ihre IL-17-Expression ganz verlieren können (68). Diese sogenannten atypischen  $T_H1$ -Zellen sind von klassischen  $T_H1$  anhand ihrer persistierenden Expression von CD161 zu unterscheiden. Auch bei der JIA scheint es sich bei einem Teil der IFN- $\gamma$  exprimierenden Zellen nicht um klassische  $T_H1$ -Zellen, sondern ursprünglich um  $T_H17$ -Zellen zu handeln, die unter dem Einfluss von IL-12 und TNF- $\alpha$  ihre IL-17-Expression verloren und ein  $T_H1$ -Muster angenommen haben (68, 70).

### 1.2.8 Follikuläre T-Helferzellen in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen

$T_{FH}$  zeigen eindrucksvoll die kritische Balance des Immunsystems zwischen Immundefizienz und Autoimmunität. Auf der einen Seite weisen beispielsweise bestimmte Patienten mit variablem Immundefektsyndrom (CVID) einen Defekt des Korezeptors ICOS (inducible co-stimulator) auf, welcher für die Entwicklung und Aufrechterhaltung des  $T_{FH}$ -Phänotyps und die Generierung von Keimzentrumsantworten essenziell ist. Bei diesen Patienten lässt sich eine deutlich gestörte Keimzentrumsentwicklung in Verbindung mit

einem schweren Mangel an Gedächtnis- $T_{FH}$ -Zellen und B-Gedächtniszellen im Blut nachweisen. Ebenso gehen das Bruton-Syndrom (XLA) und das Hyper-IgM-Syndrom mit deutlich reduzierten Gedächtnis- $T_{FH}$ -Zellen im peripheren Blut einher (71). Auf der anderen Seite begünstigt eine übermäßige Bildung bzw. Aktivierung von  $T_{FH}$ -Zellen die Entwicklung von Autoantikörpern in Autoimmunerkrankungen. Die Aktivierung von  $T_{FH}$  kann dabei nicht nur in Keimzentren, sondern auch in Inflammationsgebieten – gegebenenfalls in keimzentrumsähnlichen Strukturen (sogenannten ektopen Keimzentren) – stattfinden (56). Durch die inflammationsbedingte Gewebeschädigung ist die Umgebung dieser ektopen Keimzentren mit körpereigenen Antigenen angereichert, sodass die Interaktion von B-Zellen mit autoreaktiven  $T_{FH}$  zu somatischer Hypermutation und somit zur Selektion hochaffiner autoreaktiver B-Zellen führen könnte (56).

Neuere Studien deuten darauf hin, dass es sich bei im Blut detektierbaren CXCR5+CD4+ T-Zellen um zirkulierende Gedächtniszellform von  $T_{FH}$  ( $cT_{FH}$ ) handeln könnte (72). Seither konnten numerische Abweichungen dieser zirkulierenden  $T_{FH}$ -Zellen mit diversen Autoimmunerkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematodes, dem Sjögren-Syndrom, Myasthenia gravis, der rheumatoiden Arthritis und Diabetes mellitus Typ 1 in Verbindung gebracht werden (73-77). Im Vergleich dieser Studien fallen allerdings deutliche Unterschiede im Phänotyp der beschriebenen  $cT_{FH}$  auf.  $cT_{FH}$  können anhand ihrer Expression von CXCR3 und CCR6 in weitere Untergruppen eingeteilt werden. CXCR3+CCR6-Zellen ähneln  $T_H1$ -Zellen und werden daher häufig auch als  $cT_{FH1}$  bezeichnet, CXCR3-CCR6-Zellen wären entsprechend als  $cT_{FH2}$  und CXCR3-CCR6+ als  $cT_{FH17}$  zu bezeichnen (56, 78). PD-1, ICOS und CCR7 dienen zusätzlich als Marker des Aktivierungszustands. Bei PD-1<sup>hi</sup>ICOS+CCR7<sup>lo</sup>CXCR5+ Zellen handelt es sich um kürzlich aktivierte  $cT_{FH}$ , wohingegen PD-1<sup>lo</sup>ICOS-CCR7<sup>hi</sup>CXCR5+ Zellen eine ruhende  $cT_{FH}$ -Subpopulation bilden (56, 79, 80). Die Verschiebungen in der Zusammensetzung der genannten Subgruppen in den verschiedenen Autoimmunerkrankungen korrelierten zum Teil mit klinischen Parametern, der Expansion von Plasmazellen oder der Höhe von Autoantikörpertitern (73, 75, 76, 81, 82). Diese Veränderungen der Zusammensetzung schienen häufig durch Expansion von PD-1<sup>hi</sup> aktivierten  $cT_{FH}$  und/oder Überwiegen der  $cT_{FH1}$ - und  $cT_{FH17}$ -Phänotypen zustande zu kommen (56). Es gibt Hinweise, dass sich die genannten Subpopulationen



in ihrer Funktion in Bezug auf B-Zellen unterscheiden. Während beispielsweise besonders  $cT_{FH2}$ , aber auch  $cT_{FH17}$  die Differenzierung naiver B-Zellen zu Plasmablasten und IgG-Sekretion induzieren konnten, wurde diese Fähigkeit bei  $cT_{FH1}$  bisher nicht beobachtet (78, 81, 82). Viele der genannten Arbeiten fokussierten sich jedoch auf numerische Analysen der  $cT_{FH}$ -Populationen, sodass darüber hinaus bisher wenige Ergebnisse funktioneller Untersuchungen vorliegen.

Klassische  $T_{FH}$ -Zellen werden allgemein über die kombinierte Expression von CXCR5, Bcl-6, PD-1, ICOS und IL-21 definiert, wobei Bcl-6 als der zuverlässigste Marker für die  $T_{FH}$ -Linie gilt (63). Der Phänotyp von T-Zellen, welche B-Zell-Hilfe in Inflammationsherden von chronischen Autoimmunerkrankungen leisten und so vermutlich zu deren Pathogenese beitragen, scheint jedoch heterogener zu sein. Im Kontrast zu „klassischen“  $T_{FH}$ -Zellen der sekundär-lymphatischen Organe wurden in autoimmunen Mausmodellen und auch bei Patienten mit chronisch-inflammatorischen- bzw. Autoimmunerkrankungen sogenannte „periphere“ T-Helferzellen ( $T_{PH}$ ) beschrieben (83, 84). In der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis wurden beispielsweise T-Zellen identifiziert, welche zwar hohe Expression von PD-1, IL-21 und CXCL13, jedoch nicht Bcl-6, ICOS oder CXCR5 zeigten (85).

Die Zytokine, welche bei der antigenabhängigen Aktivierung naiver T-Zellen die Differenzierung in Richtung  $T_{FH}$  bewirken, überschneiden sich teilweise mit denjenigen, welche auch die Differenzierung von  $T_{H17}$ - bzw.  $T_{H1}$ -Zellen regulieren (61, 86). Besonders IL-12 ist beim Menschen essenziell an der Entwicklung von  $T_{FH}$  beteiligt, induziert jedoch über STAT4 übergangsweise auch bei  $T_{H1}$ -Zellen ein  $T_{FH}$ -ähnliches Transkriptionsprogramm (87). Die weitere Entwicklung in eine der beiden Zelllinien wird durch zusätzliche Transkriptionsfaktoren bestimmt (86). Dies weist auf eine mögliche Plastizität zwischen  $T_{FH}$  und anderen T-Helferzell-Populationen hin. Obwohl  $T_{FH}$  der Keimzentren sekundär lymphatischer Organe generell als distinkte Zelllinie gelten, ist fraglich, ob dies auch für die  $T_{FH}$ -ähnlichen T-Zell-Populationen in chronischen Inflammationsgebieten gilt. Bisher ist unklar, ob diese peripheren T-Helferzellen aus  $T_{FH}$  hervorgehen oder ob es sich um

andere T<sub>H</sub>-Zelllinien handelt, welche einen T<sub>FH</sub>-ähnlichen Effektorstatus mit B-Helfer-Funktion annehmen (83).

### 1.2.9 Modulare Betrachtung von CD4+ T-Helferzellen mit B-Helfer-Funktion

Die bisherigen wissenschaftlichen Arbeiten zur Rolle von T<sub>FH</sub>, cT<sub>FH</sub> und weiteren T<sub>FH</sub>-ähnlichen Zellen lassen erkennen, dass es sich bei CD4+ T-Helferzellen mit B-Helfer-Funktion im Kontext von Autoimmunerkrankungen nicht um eine einzelne, homogene Zellpopulation handelt, sondern dass diese sich zwischen den Krankheitsentitäten deutlich in Phänotyp, Polarisierung, und damit vermutlich auch in ihrer Funktion unterscheiden und teilweise einer deutlichen Plastizität zu unterliegen scheinen. Dies macht es schwer, einen universellen Biomarker-Satz für B-Helfer-Funktion zu definieren. Stattdessen soll in dieser Arbeit eine modulare Betrachtungsweise von T-Helferzellen mit B-Helfer-Funktion vorgeschlagen werden, welche die Charakterisierung von T-Zellen in folgende fünf „Dimensionen“ unterteilt.

- **Transkriptionsfaktoren:** Anhand der Expression von Bcl-6, T-bet, Blimp-1, FoxP3, ROR $\gamma$ t, GATA3 und weiteren Transkriptionsfaktoren können Rückschlüsse auf die Zugehörigkeit zu einer der T<sub>H</sub>-Subpopulationen gezogen werden. Bcl-6 ist als Master-Transkriptionsfaktor für die T<sub>FH</sub>-Differenzierung verantwortlich und steht im reziproken Antagonismus zu Blimp-1, dessen Expression die T<sub>FH</sub>-Differenzierung inhibiert und die Differenzierung in non-T<sub>FH</sub>, also alle anderen T-Effektorzell-Populationen vermittelt (60). Bcl-6 kann auch die Master-Transkriptionsfaktoren anderer T<sub>H</sub>-Subpopulationen inhibieren, diese Antagonismen sind jedoch nicht vollständig. Es sind also Zellpopulationen mit dualen Charakteristika von T<sub>FH</sub> und non-T<sub>FH</sub> möglich (59).
- **Polarisierung und Zytokinprofil:** Die Polarisierung von T-Zellen zu einem bestimmten Zytokinmuster hat maßgeblichen Einfluss auf die Interaktion mit B-Zellen. IL-21 gilt als Signatur-Zytokin von T<sub>FH</sub> und ist essenziell für B-Zell-Hilfe, allerdings ist die Expression von IL-21 nicht auf TFH beschränkt, sondern kann auch in anderen T<sub>H</sub>-Populationen auftreten (88). Umgekehrt werden von T<sub>FH</sub> auch

charakteristische Zytokine von  $T_H1$  (IFN- $\gamma$ ),  $T_H2$  (IL-4) und  $T_H17$  (IL-17) exprimiert, wenn auch auf einem niedrigeren Level (88).

- **Differenzierung und Aktivierung:** Anhand der Expression von CD45RO können T-Gedächtniszellen identifiziert werden, welche sich durch ihre CCR7-Expression weiter unterteilen lassen in zentrale T-Gedächtniszellen ( $T_{CM}$ ) und Effektorgedächtniszellen ( $T_{EM}$ ). Die Expression von PD-1 und ICOS lässt auf den Aktivierungszustand der CD4+ Zellen schließen.
- **Chemokinrezeptormuster:** Chemokine und ihre zugehörigen Rezeptoren vermitteln unter anderem die Einwanderung mononukleärer Zellen in Inflammationsgebiete. CD4+ T-Effektorzellen exprimieren hierfür ein für ihre Effektordifferenzierung charakteristisches Rezeptormuster, beispielsweise CCR2, CCR5, CXCR3 und CXCR6 für  $T_H1$  oder CCR4, CCR8, CX3CR1 und CRTH2 für  $T_H2$  (89). Für die Lokalisation von  $T_{FH}$  an die T-/B-Zell-Grenze der Keimzentren ist die Expression von CXCR5 in Verbindung mit Herabregulation des Homing-Rezeptors für die T-Zell-Zone, CCR7 verantwortlich (89, 90). Auf diese Weise können beispielsweise „follikuläre“ von „extrafollikulären“ bzw. „inflammatorischen“ Expressionsmustern unterschieden und so auf eine wahrscheinliche Lokalisation der betreffenden Zelle geschlossen werden.
- **Funktion:** Letztlich soll der Einfluss bestimmter T-Helferzell-Populationen auf B-Zellen in *in vitro* Kokulturen analysiert werden.

Keine dieser Dimensionen kann isoliert für die Charakterisierung von  $T_H$ -Populationen mit B-Helfer-Funktion herangezogen werden. Auch funktionelle *in vitro* Experimente können, aufgrund der arbiträren Bedingungen, welche durch eine Auswahl der in den Inflammationsgebieten tatsächlich vorhandenen Zellpopulationen und Zytokine entstehen, nicht zum alleinigen Nachweis von B-Helfer-Funktion ausreichen. Durch die Kombination dieser Dimensionen soll daher eine feinere Betrachtung von B-Helfer-Zellen erreicht werden, die unter anderem auch Zellplastizität besser berücksichtigen kann.

### 1.3 Fragestellung der Arbeit

In aktuellen Studien zu verschiedenen Autoimmunerkrankungen konnte die Expansion von sogenannten „peripheren T-Helferzellen“ ( $T_{PH}$ ) gezeigt werden, welche sich unter anderem durch hohe Expression von PD-1 bei fehlender Expression von CXCR5 auszeichneten.

Ziel der Arbeit ist die phänotypische und funktionelle Analyse von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen mit B-Helfer-Funktion, sowie deren Verteilung in der Synovialflüssigkeit von Patienten unterschiedlicher Subgruppen der Juvenilen Idiopathischen Arthritis.

Hieraus ergeben sich mehrere Teilfragestellungen:

- Inwiefern unterscheiden sich CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen in ihrer Zytokinproduktion zwischen der Synovialflüssigkeit und dem peripheren Blut von JIA-Patienten?
- Lässt sich eine PD-1 exprimierende T-Helferzell-Population auch in der Synovialflüssigkeit von JIA-Patienten feststellen?
- Weist diese Population, entsprechend dem vorgeschlagenen modularen Konzept, Merkmale auf, welche auf eine „B-Helfer-Funktion“ schließen lassen?
- Ist die Expansion dieser T-Zellpopulation abhängig von der JIA-Subgruppe bzw. vom Vorhandensein Antinukleärer Antikörper?

Darüber hinaus soll der funktionelle Einfluss von PD-1<sup>hi</sup> T-Helferzellen der SF auf die B-Zell-Differenzierung untersucht werden.

- Gibt es Hinweise, dass PD-1<sup>hi</sup> T-Helferzellen eine Rolle in der Differenzierung autoreaktiver B-Zellen spielen?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Ethikvotum

Für die Arbeit liegt ein positives Ethikvotum der Ethik-Kommission der Universität Würzburg mit dem Aktenzeichen 299/17 vor.

### 2.2 Probanden

Die Gelenkproben wurden von 53 JIA-Patienten im Rahmen von therapeutischen Gelenkpunktionen gewonnen. Die Einwilligungserklärungen liegen vor. Die PBMC-Proben der gesunden Kontrollen stammen von gesunden Spendern. Die Einwilligungserklärungen dieser Probanden liegen ebenfalls vor. Die klinischen Daten der eingeschlossenen Patienten sind in Tabelle 1 und 2 zusammengefasst.

Tabelle 1: Klinische Daten der untersuchten JIA-Patientenkohorte für die Zytokinanalyse innerhalb der CD4+CD45RO+ T-Gedächtniszellen

	<b>EAA</b>	<b>Oligo</b>	<b>Poly</b>	<b>Gesamt</b>
<b>Gruppengröße</b>	n = 7	n = 28	n = 6	n = 41
<b>Weiblich</b>	0 (0,0 %)	19 (67,9 %)	3 (50 %)	22 (53,7 %)
<b>Alter bei Beginn ± SD</b>	11,1 ± 4,4	7,3 ± 5,2	6,1 ± 3,5	6,8 ± 4,6
<b>ANA-Titer ≥1:160</b>	4 (57,1 %)	15 (53,6 %)	4 (66,6 %)	23 (56,1 %)
<b>Therapie</b>				
<b>Keine Medikation</b>	2 (28,6 %)	5 (17,8 %)	1 (16,7 %)	8 (19,5 %)
<b>Nur NSAR</b>	4 (57,1 %)	15 (53,6 %)	1 (16,7 %)	20 (48,8 %)
<b>MTX und/oder Steroide</b>	1 (14,3 %)	8 (28,6 %)	4 (66,7 %)	13 (31,7 %)
<b>Biologika</b>	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)

Tabelle 2: Klinische Daten der Patientenkohorte für die Untersuchung von PD-1<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup> T<sub>PH</sub>

	<b>EAA</b>	<b>Oligo</b>	<b>Poly</b>	<b>PsA</b>	<b>Gesamt</b>
<b>Gruppengröße</b>	n = 9	n = 32	n = 8	n = 4	n = 53
<b>Weiblich</b>	2 (22,2 %)	23 (71,9 %)	6 (75,0 %)	4 (100 %)	35 (66,0 %)
<b>Alter bei Beginn ± SD</b>	12,7 ± 4,9	6,9 ± 4,8	5,4 ± 3,4	12,4 ± 1,3	8,1 ± 5,2
<b>ANA-Titer ≥ 1:160</b>	5 (55,6 %)	18 (56,3 %)	5 (62,5 %)	3 (75,0 %)	31 (58,5 %)
<b>Therapie</b>					
<b>Keine Medikation</b>	2 (22,2 %)	9 (28,1 %)	1 (12,5 %)	0 (0,0 %)	12 (22,6 %)
<b>Nur NSAR</b>	2 (22,2 %)	14 (43,8 %)	0 (0,0 %)	1 (25,0 %)	17 (32,0 %)
<b>DMARDs</b>	1 (11,1 %)	7 (21,9 %)	4 (50,0 %)	2 (50,0 %)	14 (26,4 %)
<b>Steroide</b>	0 (0,0 %)	3 (9,4 %)	2 (25,0 %)	1 (25,0 %)	6 (11,3 %)
<b>Biologica</b>	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)

## 2.3 Probenaufbereitung

### 2.3.1 Isolierung von mononukleären Zellen

Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (PBMC) wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Dieses Verfahren nutzt die geringere Dichte von Monozyten und Lymphozyten im Vergleich zu den restlichen Zellbestandteilen des Blutes. Vollblut oder Synovialflüssigkeit wurden 1:1 mit 0,9% NaCl-Lösung verdünnt und vorsichtig mit einer 10 ml-Pipette auf 20 ml Ficoll-Hypaque-Lösung (Dichte 1,077 g/ml) in einem 50 ml-Falcon-Tube geschichtet, sodass sich die Phasen nicht vermischten. Nach Zentrifugation mit 1500 U/min bei Raumtemperatur und ohne Bremse waren die mononukleären Zellen, welche eine geringere Dichte als die Ficoll-Lösung aufweisen, in der Schicht oberhalb der Ficoll-Lösung verblieben, während die restlichen Zellen auf den Boden des Tubes abgesunken waren. Die oberste Zellschicht wurde anschließend vorsichtig mit einer 10 ml-Pipette abgenommen. Die mononukleären Zellen wurden entweder direkt weiterverwendet oder bis zur weiteren Verwendung in FCS 10% DMSO bei -180°C in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### **2.3.2 Vorbereitung der Gelenkproben**

Alle untersuchten Gelenkproben wurden im eingefrorenen Zustand verwendet (mononukleäre Zellen in FCS 10% DMSO). Die angetauten Proben wurden in einem 15 ml-Falcon-Tube in 3 ml RPMI/FCS/PS (500 ml RPMI + 50 ml FCS (10%) + 5 ml PS (1%)) aufgenommen und – falls nicht bereits verzeichnet – die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer mikroskopisch bestimmt. Die Suspension wurde gut durchmischt und entsprechend der Zellzahl auf fünf 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Zwei Ansätze mit verschiedenen Färbepanels wurden zur Oberflächencharakterisierung der T-Zellen genutzt, einer zur Analyse der B-Zellen und zwei weitere mit verschiedenen intrazellulären Färbungen für die Analyse der T-Zell-Zytokine.

## **2.4 Durchflusszytometrie Färbeprotokoll**

### **2.4.1 Stimulation der T-Zytokinansätze**

Für die Bestimmung des intrazellulären Zytokinprofils von T-Zellen wurden diese zunächst stimuliert. Hierzu wurden die T-Zytokin-Ansätze in RPMI/ 10 % FCS/ 1 % PS-Medium mit 50 ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)), 1µg/ml Ionomycin und 3µg/ml Brefeldin A (1X) für 4 Stunden bei 37°C inkubiert.

### **2.4.2 Oberflächenfärbung**

#### **2.4.2.1 Waschen der Zellen**

Die stimulierten und unstimulierten Zellansätze wurden bei 1500 U/min und 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde mit 1 ml FACS-Puffer resuspendiert, gut durchmischt und nochmals 10 min bei gleichen Einstellungen zentrifugiert. Danach wurde wiederum der Überstand abgesaugt. Dieser Schritt wird im Folgenden als „Waschen der Zellen“ zusammengefasst.

#### **2.4.2.2 Färbevorgang**

Optimale Färbeergebnisse wurden erzielt, wenn die mit Fluoreszenzfarbstoff beladenen Antikörper in eine Zellsuspension zwischen 50 und 100 µl gegeben wurden. Je Zellansatz wurden zunächst die Antikörper entsprechend ihrer Zielkonzentration in 20 µl FACS-Puf-

fer pipettiert (Tabelle 3, 4, 5, 6) und anschließend sorgfältig durchmischt. Der Färbecocktail wurde auf die in 50 µl FACS-Puffer suspendierten Zellen gegeben, wiederum gründlich durchmischt und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Um überschüssige, nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen anschließend ein weiteres Mal mit FACS-Puffer gewaschen. Diese Oberflächenfärbung wurde – falls nicht näher beschrieben – in den weiteren Experimenten analog durchgeführt.

Tabelle 3: Oberflächen-Panel T-Zellen 1

<b>Fluorochrom</b>	<b>Antikörper</b>	<b>Menge (µl)</b>	<b>Klon</b>
<b>FITC</b>	CXCR3	1,0	G025H7
<b>PerCP-Cy5.5</b>	CD45RO	0,5	UCHL1
<b>PE-Cy7</b>	PD-1	0,5	EH122H7
<b>APC-Cy7</b>	CD4	0,5	OKT4
<b>BV421</b>	CXCR5	1,0	J252D4
<b>PE</b>	HLA-DR	0,3	L243
<b>APC</b>	ICOS	0,5	C398.4A

Tabelle 4: Oberflächen-Panel T-Zellen 2

<b>Fluorochrom</b>	<b>Antikörper</b>	<b>Menge (µl)</b>	<b>Klon</b>
<b>FITC</b>	CXCR3	1,0	G025H7
<b>PerCP-Cy5.5</b>	CD45RO	0,5	UCHL1
<b>PE-Cy7</b>	PD-1	0,5	EH122H7
<b>APC-Cy7</b>	CD4	0,5	OKT4
<b>BV421</b>	CXCR5	1,0	J252D4
<b>PE</b>	HLA-DR	0,3	L243
<b>APC</b>	ICOS	0,5	C398.4A

Tabelle 5: Oberflächen-Panel B-Zellen

<b>Fluorochrom</b>	<b>Antikörper</b>	<b>Menge (µl)</b>	<b>Klon</b>
<b>APC</b>	CD21	0,5	Bu32
<b>PerCP-Cy5.5</b>	CD27	0,5	M-T271
<b>PE-Cy7</b>	IgM	0,3	MHM-88
<b>APC-Cy7</b>	CD19	0,5	HIB19
<b>FITC</b>	FAS	0,5	DX2
<b>PE</b>	CD11c	0,5	3.9



Tabelle 6: Oberflächen-Panels T-Zytokine 1 + 2

Fluorochrom	Antikörper	Menge (µl)	Klon
PerCP-Cy5.5	CD45RO	0,5	UCHL1
PE-Cy7	PD-1	0,5	EH122H7
APC-Cy7	CD4	0,5	OKT4

### 2.4.3 Intrazelluläre Färbung

Nach abgeschlossener Oberflächenfärbung wurden die Ansätze „B-Zellen“ und „T-Zytokine 1 + 2“ mit je 200 µl Fixationslösung für 20 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit jeweils 500 µl Permeabilisationspuffer gewaschen. Für jeden Ansatz wurden die Antikörper (Tabelle 7, 8 und 9) entsprechend der Zielkonzentration in 20 µl Permeabilisationspuffer pipettiert und gründlich durchmischt. Die in 50 µl Permeabilisationspuffer suspendierten Zellen inkubierten mit jeweils 20 µl des jeweiligen Färbecocktails für 20 min bei 4°C und wurden anschließend mit 500 µl Permeabilisationspuffer gewaschen, um überschüssige, nicht gebundene Antikörper im Überstand zu entfernen. Dieser Vorgang wird in den folgenden Experimenten als intrazelluläre Färbung zusammengefasst.

Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden die fertig gefärbten Zellen in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert und in beschriftete FACS-Analyseröhrchen überführt.

Tabelle 7: Intrazelluläre Färbung B-Zellen

Fluorochrom (ic)	Antikörper	Menge (µl)	Klon
BV421	T-bet	0,5	4B10

Tabelle 8: Intrazelluläre Färbung T-Zytokine 1

Fluorochrom (ic)	Antikörper	Menge (µl)	Klon
Alexa Fluor 488 (FITC)	TNF-α	0,5	MAB11
PE	IFN-γ	1,0	B27
APC	IL-21	0,5	3A3-N2
BV421	IL-17A	0,3	BL168

Tabelle 9: Intrazelluläre Färbung T-Zytokine 2

Fluorochrom (ic)	Antikörper	Menge (µl)	Klon
FITC	IL-2	0,5	MQ1-17H12
PE	IL-10	0,5	JES3-9D7
APC	IL-21	0,5	3A3-N2
BV421	IL-4	0,5	MP4-25D2

## 2.5 Durchflusszytometrie

### 2.5.1 Grundlagen

Die Durchflusszytometrie, hier auch als FACS-Analyse bezeichnet, ist eine Methode, mittels Emissionsspektren große Zellzahlen hinsichtlich bestimmter Oberflächenstrukturen und intrazellulärer Moleküle zu untersuchen. Diese Zielstrukturen werden mit einem Antikörper markiert, welcher an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe weisen ähnliche Absorptions-, jedoch unterschiedliche Emissionsspektren auf. Die Zellprobe wird durch sogenannte hydrodynamische Fokussierung zu einem sehr feinen Flüssigkeitsstrom umgeben von einem laminaren Hüllstrom aus Trägerflüssigkeit verjüngt, sodass die Zellen in der Messküvette einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt werden. Durch den Beschuss mit monochromatischem Laserlicht werden die Fluoreszenzfarbstoffe zur Emission angeregt und das Emissionsspektrum jeder einzelnen Zelle durch verschiedene Filter und Photodetektoren aufgenommen und als sogenanntes Ereignis (Event) gespeichert. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Menge des gebundenen Antikörpers, korreliert also mit der Anzahl gebundener Zielstrukturen pro Zelle.

Zusätzlich zu den Fluoreszenzspektren werden zwei Streulichtwerte erhoben. Das vom FSC (forward scatter) detektierte, vorwärts gerichtete Streulicht lässt Rückschlüsse auf die Zellgröße zu, das vom SSC (side scatter) aufgenommene Seitwärtsstreulicht gibt Aufschluss über die Granulation bzw. Komplexität der Zelle. Beispielsweise haben Granulozyten durch ihre hohe Menge intrazellulärer Granula eine raue Zelloberfläche, die das Licht stärker streut als eine glatte Oberfläche. Das SSC-Signal eines Granulozyten ist somit stärker als beispielsweise das eines Lymphozyten.

Die durchflusszytometrischen Analysen für diese Arbeit wurden an einem FACSCanto II mit der Software FACSDiva der Firma Becton, Dickinson durchgeführt.

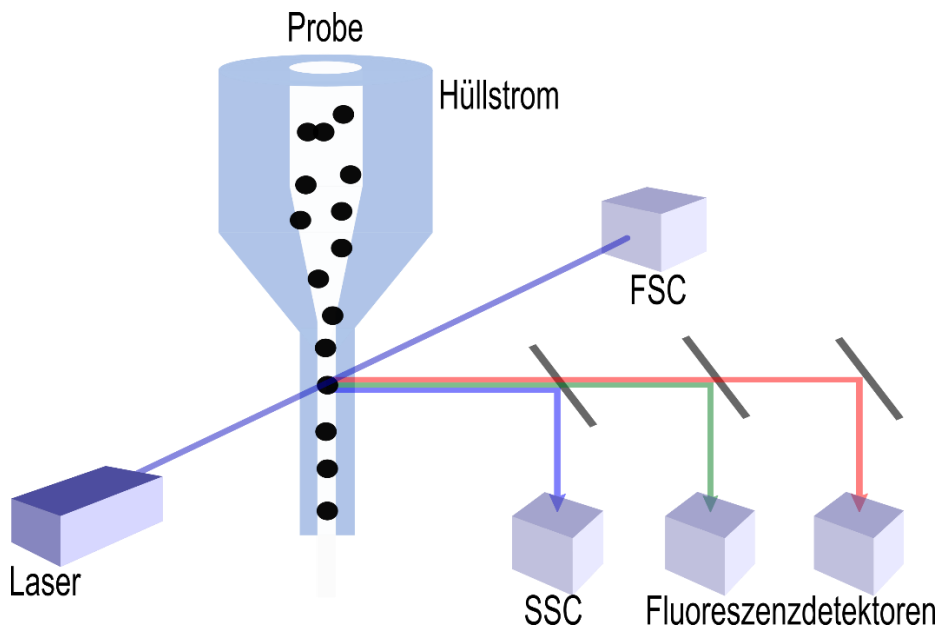


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Durchflusszytometers.

### 2.5.2 Technische Einstellungen

Passiert eine Zelle den Laserstrahl, generiert das emittierte Licht an den Photodetektoren einen Elektronenfluss proportional zur Anzahl der auftreffenden Photonen. Bevor dieser Spannungspuls in ein digitales Signal umgewandelt und gespeichert werden kann, muss er durch eine Verstärkungsspannung amplifiziert werden. Für eine optimale Auflösung der Messergebnisse muss die passende Verstärkungsspannung abhängig von den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen individuell ermittelt werden.

Zusätzlich kann ein Schwellenwert (Threshold) für den FSC definiert werden. Dieser bewirkt, dass nur Signale, die über diesem Wert liegen aufgenommen werden, also nur Zellen ab einer bestimmten Zellgröße berücksichtigt werden. Hierdurch lassen sich beispielsweise Zellfragmente von der Messung ausschließen.

Die Verstärkungsspannungen wurden zu Anfang der Messreihe ermittelt und blieben für die Dauer der durchflusszytometrischen Experimente unverändert. Als Threshold für den Forwardscatter wurde 10.275 eingestellt.

Tabelle 10: Verstärkungsspannungen des FACSCanto II

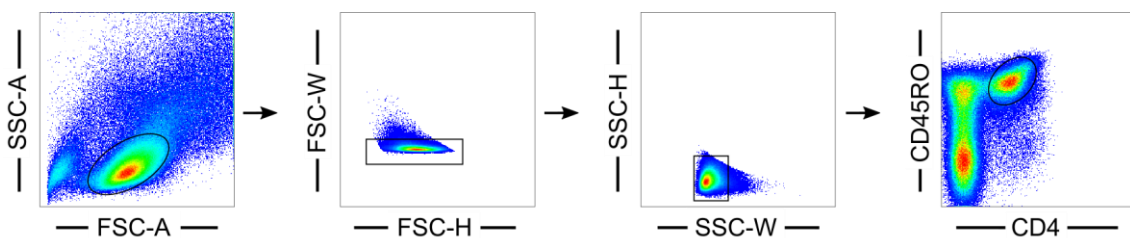
Parameter	Spannung
FSC	400 OF / 480 IC
SSC	500 OF / 530 IC
FITC	420
PE	390
PerCP-Cy5.5	540
PE-Cy7	545
APC	530
APC-Cy7	535
BV421	375

Die Fluoreszenzfarbstoffe für die Durchflusszytometrie emittieren nicht nur Licht einer einzigen Wellenlänge, sondern ein Spektrum mehrerer Wellenlängen. Da sich diese Emissionsspektren jedoch überlagern, wird das emittierte Licht eines Farbstoffs nie nur in einem Farbkanal, sondern teilweise auch in Kanälen für angrenzende Spektren detektiert. Dieser Fehler kann allerdings einfach mathematisch korrigiert werden, indem der Anteil des Signals, welches in den falschen Kanal strahlt vom Signal des betreffenden Kanals abgezogen wird. Dies wird Kompensation genannt. Um die Korrekturwerte für jedes Kanalpaar bestimmen zu können, kann eine Probe mit einer im betreffenden Farbstoff gefärbten und einer ungefärbten Population verwendet werden. Die weitere Einstellung wurde vom Durchflusszytometrie-Programm weitgehend automatisch durchgeführt.

### 2.5.3 Auswertungsstrategien

Zur Auswertung der Durchflusszytometrie wurden im Wesentlichen zwei Darstellungsformen genutzt. In Histogramm-Plots kann die Ausprägung einer bestimmten mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Zielstruktur innerhalb einer Zellpopulation dargestellt werden. Hierbei wird die Ereignisanzahl gegen die Fluoreszenzintensität als Kurve aufgetragen. Eine weitere Möglichkeit der Darstellung sind zweidimensionale Dot-Plots, in denen die Fluoreszenzintensitäten zweier Fluorochrome gegeneinander aufgetragen wird. Zu beachten ist hier, dass alle Ereignisse mit identischen Intensitätswerten als ein Punkt

innerhalb des Diagramms dargestellt werden. Die Punktdichte gibt also die Ereignishäufigkeit nicht exakt, sondern nur näherungsweise wieder. Um eine Zellpopulation innerhalb eines Dot-Plots exakt zu quantifizieren, werden sogenannte Gates benutzt, welche die Ereignisse eines bestimmten Achsenbereichs zusammenfassen. Diese sind in dieser Arbeit mit einem Prozentwert gekennzeichnet, welcher den Anteil der Ereignisse innerhalb des Gates an allen im Diagramm dargestellten Ereignissen wiedergibt. Gates dienen auch dazu, eine Zellpopulation zu selektieren, um sie weiter zu analysieren. Für alle dargestellten Analysen wurden zunächst mithilfe des FSC- und SSC-Parameters Lymphozyten selektiert, wobei Zelldoubletten, Zellfragmente und andere Zellreihen anhand ihrer Größe und Granulierung möglichst ausgeschlossen wurden. T- und B-Zellen wurden anhand ihrer Expression von CD4 bzw. CD19 charakterisiert. Abbildung 3 zeigt beispielhaft die Gating-Strategie zur Selektion mononukleärer Zellen und hierunter T-Gedächtniszellen anhand ihrer Expression von CD4 und CD45RO.



**Abbildung 3: Beispielhafte Darstellung der Gating-Strategie zur Selektion von CD45RO+CD4+ T-Gedächtniszellen.** Die Ereignisdichte ist durch ein Farbspektrum von blau nach rot gekennzeichnet. Gates sind als schwarze Kontur innerhalb der Dot-Plots dargestellt. Der Inhalt des Gates wird im jeweils rechts benachbarten Dot-Plot gezeigt. In der dargestellten Sequenz werden zunächst anhand der forward scatter- (FSC) und side scatter- (SSC) Parameter mononukleäre Zellen ausgewählt (Plot 1). Anhand der Höhen- (H) und Breitendimension (W) werden in Plot 2 und 3 Zelldoubletten ausgeschlossen. In Plot 4 sind mononukleäre Zellen dargestellt, exemplarisch sind durch ein Gate T-Gedächtniszellen anhand ihrer Expression von CD45RO und CD4 selektiert.

## 2.6 Zellsortierung und Lymphozyten-Kokultur

Um die Fähigkeit synovialer T-Zellen zur B-Zell-Hilfe und T-bet- und Blimp-1-Induktion in B-Zellen zu untersuchen, wurden Kokultur-Assays synovialer T-Zellen mit Gedächtnis-B-Zellen aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern durchgeführt, wobei PD1++ T-Zellen mit PD1+ Zellen des Gelenks und klassischen Follikulären T-Helferzellen der Tonsille verglichen wurden.

### 2.6.1 Sortierung von Zellpopulationen mittels FACS

Die B- und T-Zellpopulationen für Zellkultur-Assays wurden mithilfe von Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (FACS) isoliert. Diese funktioniert analog zur bereits beschriebenen Durchflusszytometrie, jedoch können die analysierten Zellen nicht nur als Messdaten registriert und gespeichert, sondern auch physisch voneinander getrennt und einzeln weiterverarbeitet werden. Dazu wird der Flüssigkeitsstrom in einzelne Tropfen aufgebrochen, von denen jeder nur eine einzelne Zelle enthält. Diese werden anhand ihrer Fluoreszenzeigenschaft positiv oder negativ geladen, sodass sie anschließend in einem elektrischen Feld abgelenkt und so in verschiedenen Gefäßen gesammelt werden können. Diese Methode eignet sich besonders zur Sortierung kleiner Zellpopulationen mit hoher Reinheit.

Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut wurden dazu wie oben beschrieben isoliert und Gelenkproben von JIA-Patienten und Tonsillen von gesunden Spendern aufgetaut und gewaschen. Darauf folgte eine Oberflächenfärbung der PBMC, sowie der Synovialflüssigkeits- und Tonsillenzellen analog der oben beschriebenen mit der in Tabelle 11 aufgeführten Antikörperkombination.

Tabelle 11: Oberflächen-Panel zur Sortierung von B- und T-Zellen

Fluorochrom	Zielstruktur	Volumen (µl)	Klon
PE	CD4	2,0	MT310
PE-Cy7	PD-1	1,0	EH12.2H7
PerCP Cy5.5	CD27	1,0	B-T271
APC-Cy7	CD19	1,0	HIB19
BV421	IgM	0,5	MHM-88

Die gefärbten Zellen konnten nun in folgende Populationen sortiert werden:

- PD1++HLA-DR+CD4+ TFH-ähnliche Zellen der Synovialflüssigkeit
- PD1+HLA-DR-CD4+ Zellen der Synovialflüssigkeit
- PD1++CD4+ TFH der Tonsille
- CD27+IgM-CD19+ Gedächtnis-B-Zellen des peripheren Blutes

## 2.6.2 Kokultur-Assays

Die sortierten Zellen wurden durch Zentrifugieren vom FACS-Puffermedium getrennt und in RPMI/10 % FCS/ 1 % PS aufgenommen. Jeweils  $3 \cdot 10^4$  B-Zellen wurden in verschiedenen Ansätzen mit der gleichen Zahl jeder der T-Zell-Populationen in einer 96-Well-Rundboden-Platte in 200  $\mu$ l RPMI/10 % FCS/1 % PS mit 1 $\mu$ g/ml Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kokultiviert. Um den Einfluss von IFN- $\gamma$  und IL-21 auf die B-Zell-Reifung zu untersuchen, wurde der Ansatz mit PD1++ T-Zellen des Gelenks auch unter Blockade von IFN- $\gamma$  (10  $\mu$ g/ml anti-IFN- $\gamma$ ) und IL-21 (10  $\mu$ g/ml IL-21-R Fc) getestet.

Tabelle 12: 9 Kultur-Ansätze mit Kombinationen aus B- und T-Zellen mit oder ohne IL-21- und IFN- $\gamma$ -Blockade

Nr	B <sub>mem</sub> Blut	B <sub>mem</sub> Gelenk	PD1+ Gelenk	PD1++ Gelenk	TFH Tonsille	SEB	anti- IFN- $\gamma$	Anti- IL-21	CpG
1	$3 \cdot 10^4$	---	---	---	---	---	---	---	---
2	$3 \cdot 10^4$	---	---	---	---	1 $\mu$ g/ml	---	---	---
3	$3 \cdot 10^4$	---	$3 \cdot 10^4$	---	---	1 $\mu$ g/ml	---	---	---
4	$3 \cdot 10^4$	---	---	$3 \cdot 10^4$	---	1 $\mu$ g/ml	---	---	---
5	$3 \cdot 10^4$	---	---	$3 \cdot 10^4$	---	1 $\mu$ g/ml	10 $\mu$ g/ml	---	---
6	$3 \cdot 10^4$	---	---	$3 \cdot 10^4$	---	1 $\mu$ g/ml	---	10 $\mu$ g/ml	---
7	$3 \cdot 10^4$	---	---	$3 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^4$	1 $\mu$ g/ml	---	---	---
8	---	$3 \cdot 10^4$	---	$3 \cdot 10^4$	---	1 $\mu$ g/ml	---	---	---
9	---	$3 \cdot 10^4$	---	---	---	---	---	---	2 $\mu$ g/ml

An Tag 2 wurden die Zellen mit PE anti-CD3, APC anti-CD4, APC/Cy7 anti-CD19 und BV421 anti-T-bet gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Die Plasmazelldifferenzierung und Immunglobulinproduktion wurden an Tag 5 untersucht. Vor der Färbung mit FITC anti-CD27, PE anti-CD20, APC anti-CD4, APC7Cy7 anti-CD19 und BV421 anti-CD38 wurden die Überstände zur Analyse der Immunglobulinproduktion abgenommen.

## **2.7 B-Zell *in vitro* Stimulations-Assays mit rekombinantem IFN- $\gamma$ und IL-21**

Um den Einfluss von IFN- $\gamma$  und IL-21 auf die B-Zell-Reifung, die Expression von Blimp-1 und T-bet sowie die Entstehung eines CD21<sup>lo</sup>/-T-bet<sup>+</sup> B-Zell-Phänotyps zu untersuchen, wurden B-Zellen mit rekombinantem IFN- $\gamma$  und IL-21 inkubiert. Die B-Zell-Aktivierung via B-Zell-Rezeptor (BZR) durch anti-IgM/anti-IgG, via Toll-like-Rezeptor (TLR) durch CpG und via CD40 durch CD40-Ligand wurden dabei verglichen.

### **2.7.1 Isolation von B-Zellen mittels immunomagnetischer Separation**

Zur Separation B-Zellen werden diese mit CD20-Antikörpern markiert, welche an Eisenpartikel (Beads) gekoppelt sind, sodass sie durch ein Magnetfeld isoliert werden können. Diese Methode eignet sich zur schnellen Isolation großer Zellpopulationen, allerdings mit einer geringeren Reinheit als mithilfe von FACS sortierten Zellpopulationen.

$2 \cdot 10^7$  PBMC wurden mit 40  $\mu$ l CD20-Beads (Miltenyi Biotec) in 160  $\mu$ l FACS-Puffer für 20 min bei 4 °C gefärbt und danach mit 4 ml FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden dann wieder in 250  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen und die Zellsuspension über die mit 500 $\mu$ l FACS-Puffer vorgespülten Magnetseparations-Säulen (Miltenyi Biotec) in ein 15ml-Falcon-Tube laufen gelassen. Das Zellgefäß wurde mit 250 $\mu$ l FACS-Puffer nachgespült und ebenfalls durchlaufen gelassen. Die Säulen wurden dreimal mit je 500 $\mu$ l FACS-Puffer nachgespült. Dabei sollen die mit Beads gebundenen Zellen durch das Magnetfeld in der Eisenwolle innerhalb der Säule gehalten werden, während die unmarkierten ausgeschwemmt werden.

Danach wurde die Säule in einen frischen 15ml-Falcon-Tube gesteckt und 500 $\mu$ l FACS-Puffer mit einem Stempel durch die Säule gepresst. Durch den höheren Druck wurden die im Filter verbliebenen CD20<sup>+</sup> Zellen aus dem Filter gelöst.

### **2.7.2 Stimulation via BZR und TLR9 unter Einfluss von IFN- $\gamma$ und IL-21**

Die sortierten Zellen wurden gezählt und danach zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in RPMI/FCS/PS aufgenommen. Die Reagenzien wurden auf die benötigte Arbeitskonzentration mit RPMI/FCS/PS verdünnt und folgende Ansätze auf zwei 96-Well-Rundbodenplatten in je 200 $\mu$ l RPMI/FCS/PS pipettiert:



Tabelle 13: Platte 1 für Tbet-Expression an Tag 2

Ansatz	B-Zellen	Anti-IgM/-IgG	IFN- $\gamma$	IL-21	CpG
1	5*10 <sup>4</sup>	---	---	---	---
2	5*10 <sup>4</sup>	2,0 $\mu$ g/ml	---	---	---
3	5*10 <sup>4</sup>	---	0,25 $\mu$ g/ml	---	---
4	5*10 <sup>4</sup>	---	---	0,25 $\mu$ g/ml	---
5	5*10 <sup>4</sup>	---	0,25 $\mu$ g/ml	0,25 $\mu$ g/ml	---
6	5*10 <sup>4</sup>	2,0 $\mu$ g/ml	0,25 $\mu$ g/ml	---	---
7	5*10 <sup>4</sup>	2,0 $\mu$ g/ml	---	0,25 $\mu$ g/ml	---
8	5*10 <sup>4</sup>	2,0 $\mu$ g/ml	0,25 $\mu$ g/ml	0,25 $\mu$ g/ml	---
9	5*10 <sup>4</sup>	---	---	---	2,0 $\mu$ g/ml
10	5*10 <sup>4</sup>	---	0,25 $\mu$ g/ml	---	2,0 $\mu$ g/ml
11	5*10 <sup>4</sup>	---	---	0,25 $\mu$ g/ml	2,0 $\mu$ g/ml
12	5*10 <sup>4</sup>	---	0,25 $\mu$ g/ml	0,25 $\mu$ g/ml	2,0 $\mu$ g/ml
13	5*10 <sup>4</sup>	2,0 $\mu$ g/ml	---	---	2,0 $\mu$ g/ml
14	5*10 <sup>4</sup>	2,0 $\mu$ g/ml	---	0,25 $\mu$ g/ml	2,0 $\mu$ g/ml
15	5*10 <sup>4</sup>	2,0 $\mu$ g/ml	0,25 $\mu$ g/ml	---	2,0 $\mu$ g/ml
16	5*10 <sup>4</sup>	2,0 $\mu$ g/ml	0,25 $\mu$ g/ml	0,25 $\mu$ g/ml	2,0 $\mu$ g/ml

Tabelle 14: Platte 2 für Plasmazelldifferenzierung an Tag 5

Ansatz	B-Zellen	Anti-IgM/-IgG	IFN- $\gamma$	IL-21	CpG
1	5*10 <sup>4</sup>	---	---	---	---
2	5*10 <sup>4</sup>	2,0 $\mu$ g/ml	---	---	2,0 $\mu$ g/ml
3	5*10 <sup>4</sup>	2,0 $\mu$ g/ml	0,25 $\mu$ g/ml	---	2,0 $\mu$ g/ml
4	5*10 <sup>4</sup>	2,0 $\mu$ g/ml	---	0,25 $\mu$ g/ml	2,0 $\mu$ g/ml
5	5*10 <sup>4</sup>	2,0 $\mu$ g/ml	0,25 $\mu$ g/ml	0,25 $\mu$ g/ml	2,0 $\mu$ g/ml

An Tag 2 wurde die Tbet-Expression mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Zellen wurden mit FACS-Puffer gewaschen und danach eine Oberflächenfärbung wie bereits beschrieben durchgeführt. Nach Fixation und Permeabilisation folgte eine intrazelluläre Färbung mit Tbet. In der durchflusszytometrischen Analyse wurde dann die CD19+CD27- naive B-Zell Population hinsichtlich der Expression von Tbet untersucht.

Tabelle 15: Färbepanel zur Bestimmung von T-bet an Tag 2

Zielstruktur	Klon	Fluorochrom	Volumen (µl)
CD19	HIB19	APC-Cy7	0,3
CD69	FN50	PE-Cy7	0,2
CD27	B-T271	PerCP Cy5.5	0,3
CD86	IT2.2	APC	0,2
T-bet (intrazellulär)	4B10	BV421	0,5

Um die Plasmazelldifferenzierung an Tag 5 zu bestimmen, wurde folgendes Färbepanel verwendet:

Tabelle 16: Färbepanel zur Untersuchung der Plasmazelldifferenzierung an Tag 5

Zielstruktur	Klon	Fluorochrom	Volumen (µl)
CD19	HIB19	APC-Cy7	0,3
CD11c	3.9	PE	0,3
CD27	B-T271	PerCP Cy5.5	0,3
CD21	Bu32	APC	0,3
CD38	HIT2	BV421	0,3

## 2.8 Statistische Auswertungen

### 2.8.1 t-Test und Mann-Whitney-U-Test

In dieser Arbeit fand der Zweistichproben-t-Test Verwendung, welcher zwei unabhängige Stichproben auf signifikanten Unterschied prüft. Voraussetzung für die Anwendung ist, dass die Messungen unabhängig voneinander sind und die zu vergleichende abhängige Variable mindestens intervallskaliert ist. Darüber hinaus sollten die Daten beider Stichproben normalverteilt sein und eine annähernd gleiche Varianz aufweisen. Mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests kann die Normalverteilung der einzelnen Stichproben überprüft werden. Lieferte dieser Test kein signifikantes Ergebnis ( $p \geq 0,05$ ), wurde von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen. Andernfalls kann der Mann-Whitney-U-Test genutzt werden. Dieser untersucht – wie auch der t-Test –, ob zwei ungepaarte Stichpro-

ben zur selben Grundgesamtheit gehören. Im Gegensatz zum t-Test handelt es sich jedoch beim Mann-Whitney-U-Test um einen non-parametrischen Test, welcher keine annähernde Normalverteilung der Stichproben voraussetzt.

Kann man keine Varianzhomogenität zwischen den Stichproben voraussetzen, kann eine abgewandelte Form des t-Tests, der sogenannte Welch-Test gewählt werden. Dieser gilt als robuster gegenüber Verletzungen der Varianzhomogenität. Der t-Test kann für gepaarte oder ungepaarte Stichproben durchgeführt werden.

Messwerte wurden, falls nicht anders angegeben, immer in der Form Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

### **2.8.2 Varianzanalyse von mehr als zwei Stichproben**

Um mehr als zwei Gruppen auf signifikante Unterschiede zu untersuchen, kann auf die einfaktorielle ANOVA (analysis of variance) zurückgegriffen werden. Ein signifikantes Ergebnis bedeutet hier, dass sich mindestens zwei der untersuchten Gruppen signifikant voneinander unterscheiden. Anschließend werden die einzelnen Gruppen mit multiplen paarweisen Vergleichen, sogenannten post-hoc Tests untersucht. In dieser Arbeit wurde der Tukey-Test als post-hoc-Test bei normalverteilten Daten und Varianzhomogenität verwendet. Bei nicht-normalverteilten Daten kann alternativ der Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn-Test als post-hoc Test bzw. die Welch-ANOVA zum Einsatz kommen.

### **2.8.3 Korrelationsanalyse**

Zur Prüfung eines linearen Zusammenhangs zweier mindestens intervallskalierter Variablen wurde in dieser Arbeit die Produkt-Moment-Korrelation (auch Bravais-Pearson-Korrelation genannt) verwendet. Der Korrelationskoeffizient  $r$  kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen, wobei +1 einen perfekten positiven Zusammenhang und -1 einen perfekten negativen beschreiben würde. Wäre  $r=0$ , würde dies bedeuten, dass überhaupt kein linearer Zusammenhang zwischen den beiden Variablen besteht. Zusätzlich zum Korrelationskoeffizienten wird ein Signifikanzniveau angegeben, welches angibt, wie signifikant sich  $r$  vom Wert Null unterscheidet.

#### **2.8.4 Hauptkomponentenanalyse**

Die Hauptkomponentenanalyse (engl.: principal component analysis, PCA) ist eine Methode zur Vereinfachung hochdimensionaler Daten. Die Daten werden dabei mit geometrischen Methoden auf weniger Dimensionen reduziert, die sogenannten Hauptkomponenten. Die erste Hauptkomponente wird so gewählt, dass durch sie die größtmögliche Streuung der ursprünglichen Daten dargestellt wird. Alle weiteren Hauptkomponenten werden jeweils so gewählt, dass sie den jeweils nächstgrößten Anteil der Gesamtstreuung enthalten und nicht mit den anderen Hauptkomponenten korrelieren.

Für die Hauptkomponentenanalyse wurde das Webtool ClustVis mit der Methode Singulärwertzerlegung (engl. Singular value decomposition, SVD) verwendet.

#### **2.8.5 Hierarchische Clusteranalyse**

Die hierarchische Cluster-Analyse ist ein Verfahren zur Darstellung der Distanz zwischen Daten. Datenobjekte, die eine geringere Distanz zueinander aufweisen als zum restlichen Datensatz werden in Clustern gruppiert. Durch Zusammenfassung der bereits gebildeten Cluster zu größeren Clustern entsteht eine Cluster-Hierarchie, welche beispielsweise als Baumdiagramm dargestellt werden kann.

In dieser Arbeit wird die hierarchische Cluster-Analyse in Kombination mit einer sogenannten Heatmap dargestellt, in welcher Datenwerte in ein Farbspektrum umgewandelt werden, beispielsweise von blau für niedrige Werte bis rot für hohe Werte. Beim phänotypischen Vergleich von PD1<sup>hi</sup> der Tonsille, PD1<sup>hi</sup> und PD1<sup>lo</sup> der Synovialflüssigkeit repräsentieren die Spalten der Heatmap die Zellpopulationen, entsprechend den hierarchischen Clustern sortiert. Die untersuchten phänotypischen Marker sind in den Zeilen dargestellt, die Farbwerte sind zeilenweise normalisiert.

Für die Heatmap und hierarchische Clusteranalyse wurde ebenfalls das Webtool ClustVis verwendet.

### **2.8.6 T-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE)**

T-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE) ist ein Algorithmus zur Dimensionsreduktion, mithilfe dessen hochdimensionale Datensätze wie durchflusszytometrische Analysen in einem zwei- oder dreidimensionalen Streudiagramm visualisiert werden können. Stark vereinfacht ausgedrückt ist die Ähnlichkeit zweier Datenpunkte als räumliche Nachbarschaft in diesem Diagramm dargestellt, wobei so viel wie möglich von der aussagekräftigen hochdimensionalen Struktur der Daten erhalten werden soll (91). Die t-SNE-Analysen für diese Arbeit wurden mithilfe der Barnes-Hut-Implementation des Algorithmus in der Durchflusszytometrie-Software FlowJo mit 500 Iterationen, einer Perplexität von 20 und einem Präzisionsfaktor von  $\Theta = 0,5$  durchgeführt (92).

### **2.8.7 Signifikanz**

Ab einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  wird von statistischer Signifikanz gesprochen. Die Signifikanzniveaus werden in dieser Arbeit mit Sternen abgebildet. Ein Stern (\*) steht für  $p < 0,05$ , zwei Sterne (\*\*) für  $p < 0,01$ , drei Sterne (\*\*\*) für  $p < 0,001$ , vier Sterne (\*\*\*\*) für  $p < 0,0001$ .

## 2.9 Materialien und Geräte

### 2.9.1 Reagenzien

Tabelle 17: verwendete Reagenzien

Reagenz	Hersteller
RPMI-1640 Medium (RPMI)	Sigma-Aldrich, München
fetales Kälberserum FBS Superior (FCS)	Biochrom GmbH, Berlin
Penicillin / Streptomycin (PS)	Sigma-Aldrich, München
Phosphate-Buffered Saline (PBS)	Life Technologies, Carlsbad, CA (USA)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma-Aldrich, München
Ionomycin 10 mg/ml	Sigma-Aldrich, München
Brefeldin A Solution 5 mg/ml	Biolegend, San Diego, CA (USA)
Fixation/Permeabilization Concentrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Fixation/Permeabilization Diluent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Permeabilization Buffer 10X (stock solution)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
CpG ODN 2006	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Rekombinantes humanes IFN- $\gamma$	PeproTech, Cranbury, NJ (USA)
Rekombinantes humanes IL-21	PeproTech Cranbury, NJ (USA)
Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB)	Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Universität Würzburg

### 2.9.2 Antikörper

Tabelle 18: Antikörper für Durchflusszytometrie

Zielstruktur	Klon	Fluorochrom	Hersteller
CD11c	3.9	FITC	BioLegend
CD19	H1B19	FITC	BioLegend
CD21	Bu32	FITC	BioLegend
CD38	HIT2	FITC	BioLegend
CCR7	G043H7	FITC	BioLegend
CXCR3	G025H7	FITC	BioLegend
FoxP3	PCH101	FITC	eBioscience
HLA-DR	L243	FITC	BioLegend
TIM3	F38-2E2	FITC	BioLegend

<b>CD11c</b>	3.9	PE	eBioscience
<b>CD127</b>	hIL-7R-M21	PE	BD Biosciences
<b>cMAF</b>	sym0F1	PE	eBioscience
<b>Bcl-6</b>	7D1	PE	BioLegend
<b>CCR5</b>	J418F1	PE	BioLegend
<b>CCR6</b>	G034E3	PE	BioLegend
<b>HLA-DR</b>	L243	PE	BioLegend
<b>IFN-γ</b>	B27	PE	BioLegend
<b>IL-10</b>	JES3-9D7	PE	BioLegend
<b>KI-67</b>	Ki-67	PE	BioLegend
<b>PSGL1</b>	KPL-1	PE	BioLegend
<b>CD4</b>	MT310	PE	DakoCytomation
<b>CD3</b>	MHCD0304	PE	Caltag
<b>TIGIT</b>	A15153G	PE	BioLegend
<b>CD38</b>	HIT2	PE/Cy7	BioLegend
<b>CD69</b>	FN50	PE/Cy7	BioLegend
<b>IgD</b>	IA6-2	PE/Cy7	BioLegend
<b>IgM</b>	MHM-88	PE/Cy7	BioLegend
<b>PD-1</b>	EH12.2H7	PE/Cy7	BioLegend
<b>Bcl6</b>	IG191E/A8	APC	BioLegend
<b>Blimp-1</b>	6D3	APC	BD Biosciences
<b>CD21</b>	Bu32	APC	BioLegend
<b>CD86</b>	IT2.2	APC	BioLegend
<b>CCR2</b>	K036C2	APC	BioLegend
<b>CCR7</b>	G043H7	APC	BioLegend
<b>Fas</b>	DX2	APC	BioLegend
<b>ICOS</b>	C398.4A	APC	BioLegend
<b>ICOSL</b>	2D3	APC	BioLegend
<b>IgM</b>	MHM-88	APC	BioLegend
<b>IL-21</b>	3A3-N2	APC	BioLegend
<b>LAG3</b>	7H2C65	APC	BioLegend
<b>OX40</b>	Ber-ACT35	APC	BioLegend
<b>CD4</b>	OKT4	APC/Cy7	BioLegend
<b>CD19</b>	HIB19	APC/Cy7	BioLegend
<b>HLA-DR</b>	L243	APC/Cy7	BioLegend
<b>CD25</b>	BC96	Pacific Blue	BioLegend
<b>CD38</b>	HIT2	BV421	BioLegend
<b>CD45</b>	HI30	BV421	BioLegend
<b>CXCR5</b>	J252D4	BV421	BioLegend
<b>IgM</b>	MHM-88	BV421	BioLegend
<b>IL-17A</b>	BL168	BV421	BioLegend
<b>T-bet</b>	4B10	BV421	BioLegend
<b>CD27</b>	B-T271	PerCP/Cy5.5	BioLegend
<b>CD45RO</b>	UCHL1	PerCP/Cy5.5	BioLegend
<b>CD57</b>	QA17A04	PerCP/Cy5.5	BioLegend
<b>IFN-γ</b>	B27	PerCP/Cy5.5	BioLegend

Tabelle 19: neutralisierende Antikörper

Typ	Herkunft/Klon	Hersteller
Anti-IFN- $\gamma$	B27	BioLegend
IL-21R-Fc	Recombinant mouse IL-21R-Fc chimera	BioLegend
F(ab') <sub>2</sub> anti-IgM	Fragment Rabbit anti-human IgM	Jackson Laboratories
F(ab') <sub>2</sub> anti-IgG	Fragment Rabbit anti-human IgG	Jackson Laboratories

### 2.9.3 Materialien

Tabelle 20: Verbrauchsmaterialien

Materialbezeichnung	Hersteller
SafeSeal Reagiergefäß 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht
Cellstar tube 15ml	greiner bio-one, Frickenhausen
Cellstar tube 50ml	greiner bio-one, Frickenhausen
Pipetten (Eppendorf research)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen 20ul, 200ul, 1000ul	Sarstedt, Nümbrecht
Cellstar Serologische Pipette 10ml, steril	greiner bio-one, Frickenhausen
FACS-Röhrchen	Sigma-Aldrich, München
Parafilm M	Pechiney Plastic Packaging, Washington, NJ
Safety-Multifly Venenpunktionsbesteck	Sarstedt, Nümbrecht
S-Monovette Blutentnahmeröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten (96 well, Rundboden)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
MACS Separations-Kit (CD20 Microbeads)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

### 2.9.4 Geräte

Tabelle 21: Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Zentrifuge (5804 R)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe (Pipetboy acu)	Integra Biosciences, Hudson, NH (USA)
Pumpe	HLC
Abzugshaube	Gelaire, Sydney (Australien)
Durchflusszytometer BD FACSCanto II	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)



Durchflusszytometer BD FACSAria III	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)
Vortexmischer (MS2 Minishaker)	IKA Werke, Staufen im Breisgau
-80°C Gefrierschrank	Forma Scientific, Inc.
-20°C Gefrierschrank	Liebherr, Bulle (Schweiz)
Kühlschrank 4°C	Liebherr, Bulle (Schweiz)
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen
Mikroskop (Wilovert 30, Objektiv A 10/0.25 (100x))	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Brutschrank (Heraeus B 5060 EK/CO2)	Heraeus, Hanau

### 2.9.5 Software

Tabelle 22: Software

Software	Hersteller
FACSDiva	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)
FlowJo	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)
Inkscape	The Inkscape Project
EndNote	Clarivate Analytics, Boston, MA (USA)
LibreOffice	The Document Foundation
Microsoft Office	Microsoft Corporation, Redmond, WA (USA)
Prism	GraphPad Software, San Diego, CA (USA)
ClustVis	Web-Tool von T. Metsalu und J. Vilo

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Zytokinmuster von T-Helfer-Zellen in Gelenken von JIA-Patienten

##### 3.1.1 IL-21 produzierende CD4+ T-Helfer-Zellen akkumulieren in Gelenken von JIA-Patienten

Um der Frage nachzugehen, ob in der Synovialflüssigkeit (SF) von JIA-Patienten eine T-Zell-Population existiert, welche indirekte Hinweise auf eine B-Helfer-Funktion zeigen, wurden zunächst CD4+CD45RO+ Gedächtnis-T-Zellen hinsichtlich ihres Zytokinprofils mit besonderem Fokus auf IL-21 untersucht. Peripheres Blut (PB) und SF von 14 JIA-Patienten wurde hierzu für einen gepaarten Vergleich der Gedächtnis-T-Zell-Populationen verwendet, wobei insbesondere die Signatur-Zytokine von T<sub>H</sub>1 (IFN- $\gamma$ ), T<sub>H</sub>2 (IL-4), T<sub>H</sub>17 (IL-17) und T<sub>FH</sub>-Zellen (IL-21) untersucht wurden.

Ein deutlicher Anteil der CD4+CD45RO+ Zellen der SF exprimierte die für T<sub>H</sub>1 Zellen charakteristischen Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  (Abbildung 4). Während sich der Anteil TNF- $\alpha$  produzierender Zellen nicht deutlich zwischen SF und peripherem Blut unterschied (PB 57,7  $\pm$  12,5 % vs. SF 67,0  $\pm$  15,1 %; p = 0,12), war der Anteil IFN- $\gamma$  exprimierender Zellen in der SF gegenüber dem PB signifikant erhöht (PB 29,5  $\pm$  13,2 % vs. SF 49,9  $\pm$  9,5 %; p < 0,001) (Abbildung 4).

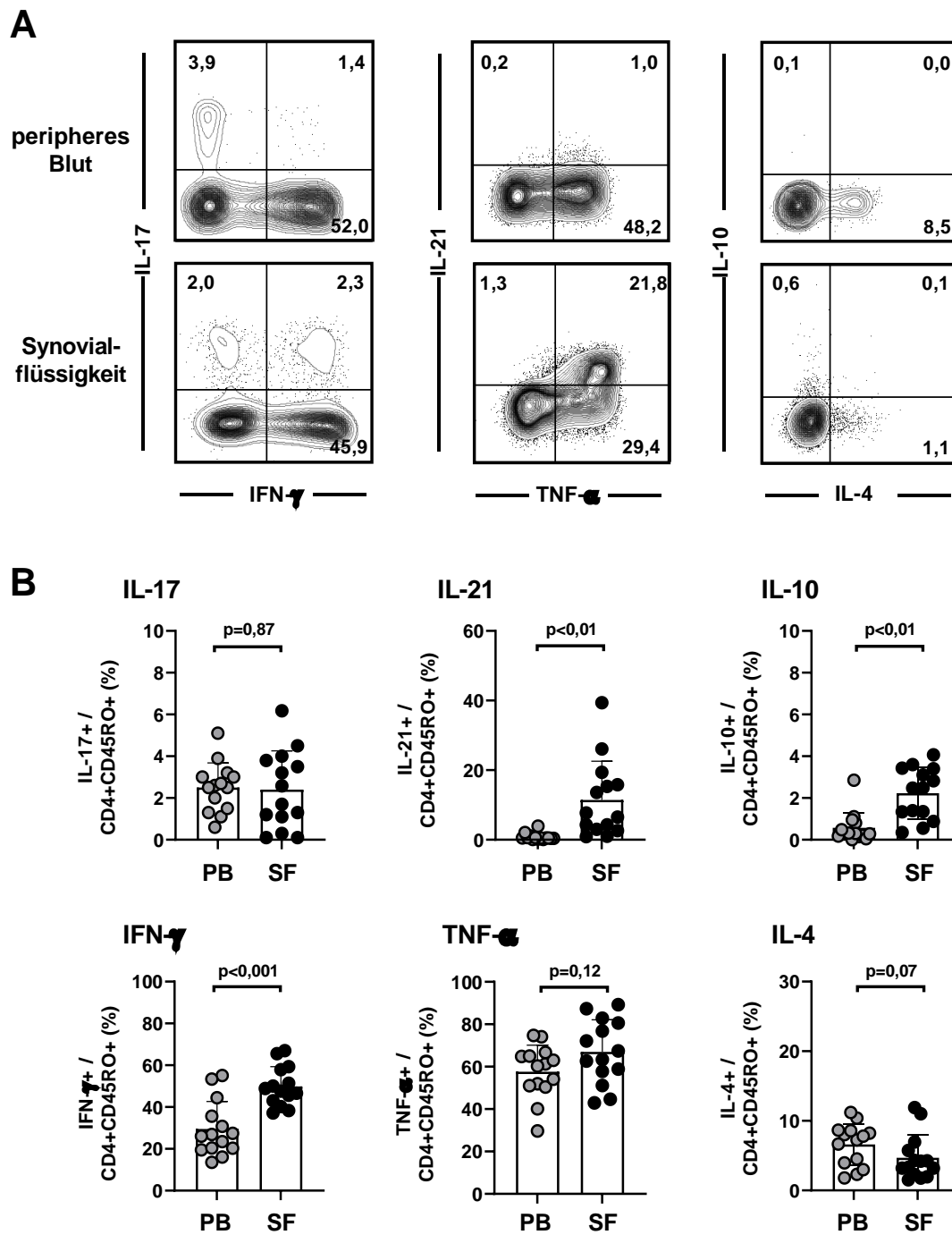
IL-17 wurde von einer ähnlich großen Fraktion von Gedächtnis-T-Zellen in PB und SF gebildet (PB 2,5  $\pm$  1,2% vs. SF 2,4  $\pm$  1,9 %; p = 0,82), allerdings war der Anteil der Zellen, welche IFN- $\gamma$  und IL-17 koexprimierten geringfügig höher in der SF (PB 0,4  $\pm$  0,6 % vs. SF 1,1  $\pm$  0,9 %; p < 0,05) (Abbildung 4).

Die Zahl der IL-10 produzierenden Zellen war ebenfalls in der SF gegenüber dem PB erhöht (PB 0,6  $\pm$  0,7 % vs. 2,2  $\pm$  1,2 %; p < 0,01; Abbildung 4). Die IL-4-Produktion war in beiden Kompartimenten vergleichbar (PB 6,6  $\pm$  3,0 % vs. SF 4,7  $\pm$  3,2 %; p = 0,08; Abbildung 4).

Interessante Unterschiede ergaben sich in der Expression von IL-21. Während IL-21 produzierende Zellen unter den CD4+CD45RO+ Zellen des PB kaum vertreten waren (0,8  $\pm$  1,0 %), waren sie in der SF deutlich angereichert (11,4  $\pm$  11,1 %; p < 0,01; Abbildung 4).

Allerdings unterlag die Größe der IL-21+ Fraktion einer breiten Streuung und machte zwischen 0,9 % und 39,4 % der CD4+CD45RO+ Zellen der SF aus.

Diese Untersuchungen deuteten also darauf hin, dass innerhalb der SF von JIA-Patienten das Zytokin-Milieu in Richtung der T<sub>H</sub>1-typischen Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  verschoben ist. Zusätzlich konnte jedoch eine Expansion von IL-21+CD4+CD45RO+ Zellen beobachtet werden. IL-21 gilt als Signatur-Zytokin von Follikulären T-Helferzellen (T<sub>FH</sub>) und leistet einen entscheidenden Beitrag zur B-Zell-Differenzierung (57). Dies lässt also vermuten, dass eine T-Helferzell-Population in den Gelenken von JIA-Patienten akkumuliert, welche eventuell zusätzlich zu IL-21 weitere Ähnlichkeiten mit Follikulären T-Helferzellen aufweisen könnte.



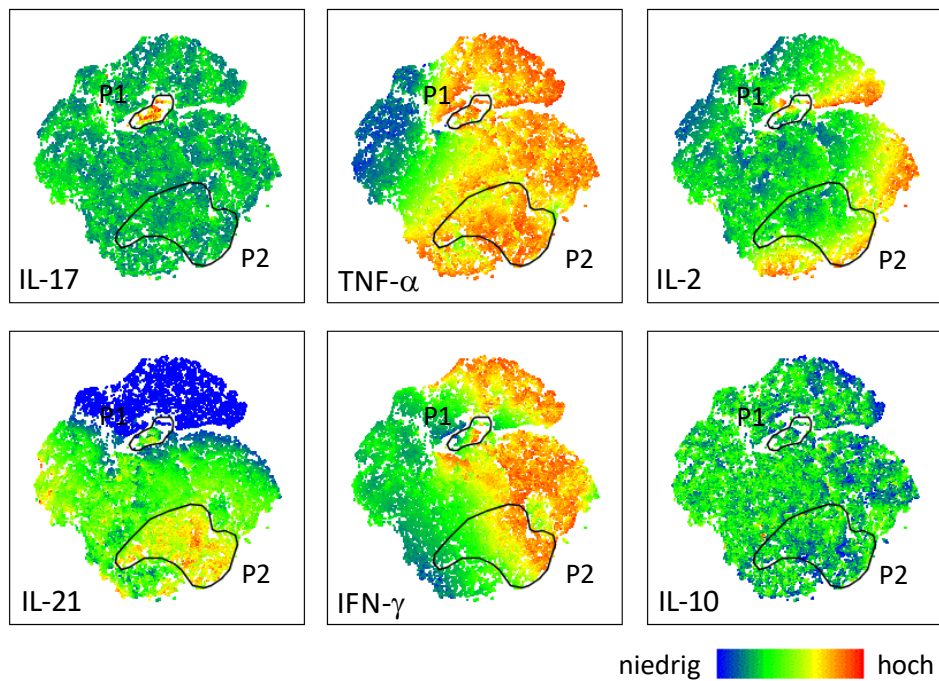
**Abbildung 4:** Zytokinexpression in CD4+CD45RO+ Populationen aus PB und SF von JIA-Patienten. **A** Repräsentative Kontur-Plots der Zytokinexpression von CD4+CD45RO+ Gedächtnis-Zellen des peripheren Blutes und der Synovialflüssigkeit eines JIA-Patienten **B** Anteil der Zytokin exprimierenden Zellen an allen CD4+CD45RO+ Zellen verglichen zwischen gepaarten Blut- und Synovialflüssigkeitsproben von JIA-Patienten (n=14, 2 ANA- Oligoarthritis, 9 ANA+ Oligoarthritis, 1 ANA- Polyarthritis, 1 ANA+ Polyarthritis, 1 ANA- EAA). Einzelwerte als Punkte, Mittelwert ± Standardabweichung als Säulen dargestellt. Gepaarter t-Test.

### 3.1.2 Dichotome Expression von IL-21 und IL-17 in T-Helferzellen der Synovialflüssigkeit

Um für die JIA charakteristische Koexpressionsmuster von T-Gedächtniszellen der SF präziser beschreiben zu können, wurde eine Dimensionalitätsreduktion mithilfe des t-SNE-Algorithmus durchgeführt. Die hierfür verwendeten durchflusszytometrischen Daten von 6 ausgewählten JIA-Patienten wurden in einem simultanen Färbe- und Analysevorgang erhoben um das Risiko einer Verfälschung der t-SNE-Analyse durch mögliche tagesabhängige Schwankungen des Stimulations- und Färbeprozesses zu minimieren.

Zwei Zellpopulationen schienen hier anhand ihrer Expression von IL-17 („P1“) bzw. IL-21 („P2“) voneinander abgrenzbar (Abbildung 5 A). Die IL-17 exprimierende Population P1 zeigte ein für  $T_H1/T_H17$ -Zellen typisches Zytokinmuster mit Koexpression von  $TNF-\alpha$  ( $94,9 \pm 7,8 \%$ ) und  $IFN-\gamma$  ( $68,4 \pm 14,3 \%$ ) (Abbildung 5 B). In der IL-21 produzierenden Population P2 war jedoch wider Erwarten keine Expression des für B-Zell-Hilfe typischen Zytokins IL-10 zu sehen, sondern ebenfalls eine hohe Produktion von  $TNF-\alpha$  ( $85,1 \pm 20,7 \%$ ) und  $IFN-\gamma$  ( $65,1 \pm 15,2 \%$ ) (Abbildung 5 B). P1 und P2 waren also durch ihre nahezu ausschließliche Expression von IL-21 oder IL-17 voneinander separiert, zeigten darüber hinaus allerdings ein eher gleichförmiges,  $T_H1$ -ähnliches Zytokinmuster mit  $IFN-\gamma$ - und  $TNF-\alpha$ -Expression.

A



B

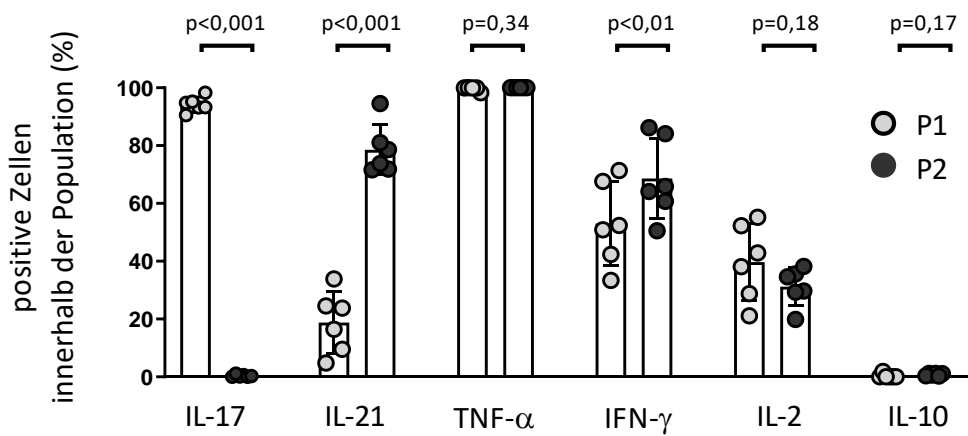
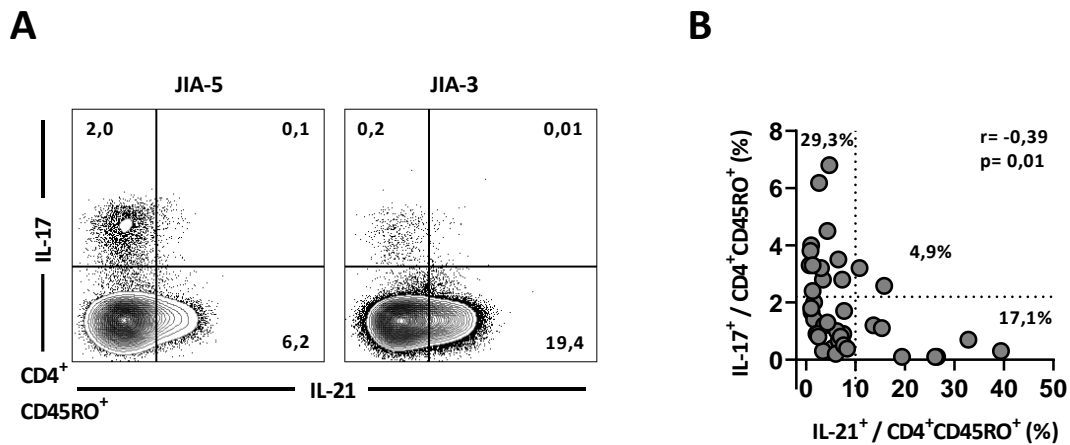


Abbildung 5: Zwei T-Zell-Populationen in der Synovialflüssigkeit von JIA-Patienten grenzen sich durch ihre Expression von IL-21 bzw. IL-17 voneinander ab, koexpressieren jedoch beide IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . **A** t-SNE-Analyse der zusammengeführten durchflusszytometrischen Analysen synovialer CD4+CD45RO+ Zellen von 6 JIA-Patienten (1 ANA- Oligoarthritis, 3 ANA+ Oligoarthritis, 2 ANA- Polyarthritis). Heatmaps zeigen die Expressionslevel (blau: niedrig, rot: hoch) von IL-17, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-21, IFN- $\gamma$  und IL-10 innerhalb der CD4+CD45RO+ Population. Zwei Subpopulationen, P1 und P2 sind anhand ihrer Expression von IL-17 bzw. IL-21 markiert. **B** Prozentualer Anteil Zytokin-expressierender Zellen innerhalb von P1 und P2 für jeden einzelnen der 6 JIA-Patienten. Säulen mit Fehlerbalken zeigen Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, Einzelwerte sind als Punkte dargestellt; gepaarter t-Test.



**Abbildung 6:** Zwischen IL-17+ und IL-21+ T-Gedächtniszellen der Synovialflüssigkeit besteht eine negative Korrelation. **A** Repräsentative Kontur-Plots zweier JIA-Patienten (JIA-3 und JIA-5) zeigen die Expression von IL-17 und IL-21 in CD4+CD45RO+ T-Gedächtniszellen. **B** Korrelation des Anteils IL-17+ und IL-21+ Zellen innerhalb der CD4+CD45RO+ T-Gedächtniszellpopulation der Synovialflüssigkeit von n=41 JIA-Patienten. Einzelwerte sind als Kreise dargestellt. Die gestrichelten Linien markieren die Einteilung in 4 Subgruppen, der relative Anteil dieser Subgruppen ist als Prozentwert angegeben.  $r$ , Korrelationskoeffizient nach Pearson.

Bei individueller Betrachtung der Populationsgrößen innerhalb jedes einzelnen der 6 Patienten ließ sich erahnen, dass diese beiden Populationen hinsichtlich ihres Anteils an der gesamten CD4+CD45RO+ T-Gedächtniszellpopulation einer negativen Korrelation zu folgen schienen. Dieser Verdacht erhärtete sich durch die Analyse IL-17 bzw. IL-21 exprimierender Zellen innerhalb der CD4+CD45RO+ T-Gedächtniszellen in einer größeren Kohorte mit 41 JIA-Patienten, welche als EAA, Oligoarthritis oder Polyarthritis klassifiziert wurden (Tabelle 1). Die Anteile IL-17+ und IL-21+ T-Zellen folgten in der Tat einer negativen Korrelation ( $r = -0,39$ ;  $p = 0,01$ ; Abbildung 6). Die JIA-Patienten konnten darüber hinaus in Gruppen eingeteilt werden, die entweder eine hohe Frequenz von IL-17+ oder IL-21+ T-Helferzellen oder keine der beiden T-Helferzell-Populationen aufwiesen. Ein gleichzeitiges Auftreten beider Populationen war bei fast keinem der untersuchten JIA-Patienten in nennenswertem Maße festzustellen (Abbildung 6 B).

### 3.1.3 IL-21+ T-Helferzellen akkumulieren bevorzugt in Gelenken von ANA+ JIA-Patienten

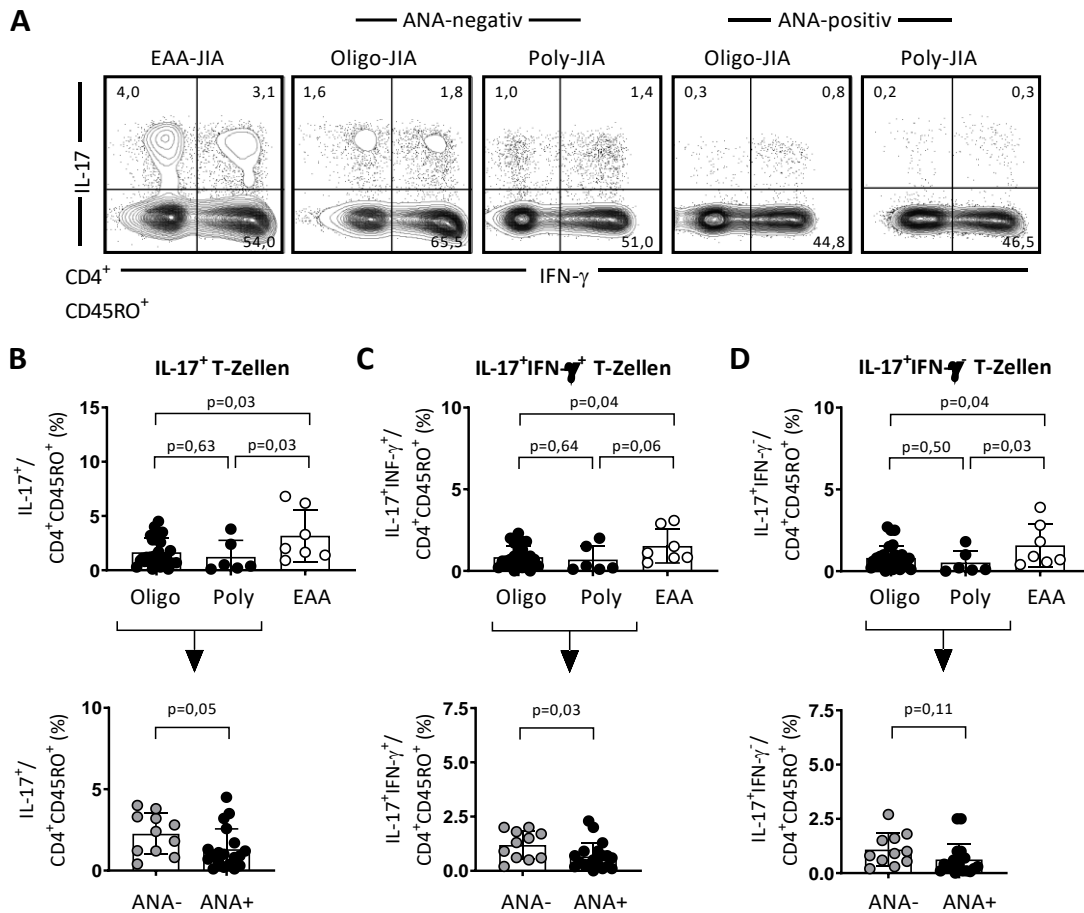
Das gegenläufige Auftreten von IL-17+ und IL-21+ T-Helferzellen in der Synovialflüssigkeit warf die Frage auf, ob diese Zellpopulationen sich in ihrem Auftreten mit der klinischen Klassifikation in EAA, Oligoarthritis und Polyarthritis decken. Daher wurden die Anteile IL-17 bzw. IL-21 exprimierender Zellen zwischen den genannten JIA-Subgruppen verglichen (n = 41). Da ANA+ Patienten eine klinisch homogene Subgruppe innerhalb der Oligo- und Polyarthritis-Gruppe bilden, wurden zudem ANA+ und ANA- Patienten innerhalb dieser beiden ILAR-Gruppen miteinander verglichen. In Anlehnung an existierende Studien zu ANA+ JIA-Patienten wurden 4 Patienten mit grenzwertig positivem ANA-Titer von 1:80 von diesem Teil der Analyse ausgeschlossen (17).

Im Vergleich zwischen den JIA-Subgruppen war der Anteil IL-17 exprimierender T-Zellen bei EAA-Patienten größer als in der Gruppe der Oligo- und Polyarthritispatienten (EAA  $3,2 \pm 2,4$  % vs. Oligoarthritis  $1,7 \pm 1,3$  %,  $p = 0,03$  und vs. Polyarthritis  $1,2 \pm 1,5$  %,  $p < 0,03$ ; Abbildung 7 B). ANA+ Patienten wiesen mit  $1,3 \pm 1,3$  % einen tendenziell etwas geringeren Anteil IL-17-exprimierender Zellen auf als ANA- Patienten mit  $2,3 \pm 1,3$  % ( $p = 0,05$ ). IL17+IFN- $\gamma$ + T-Zellen bildeten ebenfalls bei EAA-Patienten einen geringfügig erhöhten Anteil von  $1,5 \pm 1,0$  % aller CD4+CD45RO+ Gedächtniszellen gegenüber Oligo- ( $0,8 \pm 0,7$  %;  $p = 0,04$ ) und Polyarthritispatienten ( $0,7 \pm 0,8$  %;  $p = 0,06$ )(Abbildung 7 C).

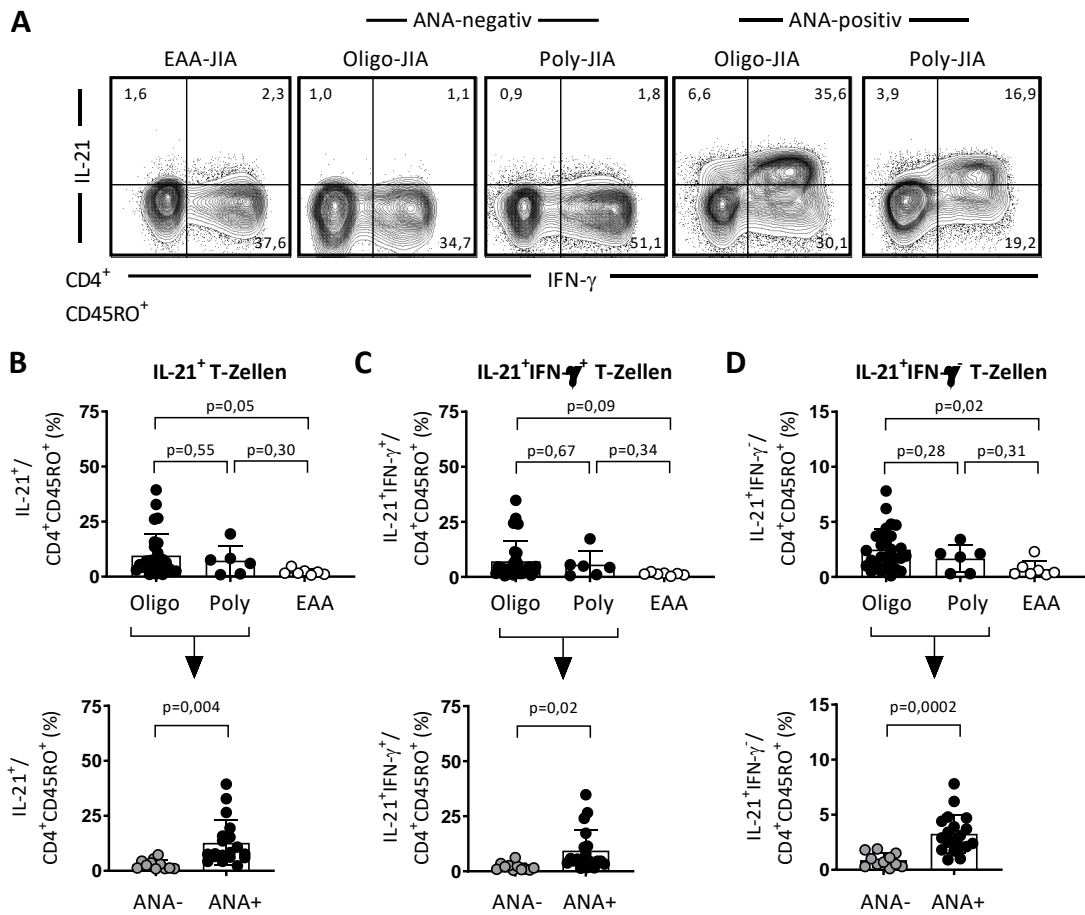
Im Gegensatz dazu war der Anteil IL-21 produzierender Zellen tendenziell etwas höher in der Oligoarthritis-Gruppe als bei EAA-Patienten (Oligoarthritis  $9,6 \pm 6,7$  % vs. EAA  $2,1 \pm 1,3$  %;  $p = 0,05$ ; Abbildung 8 B). Der Vergleich zwischen ANA+ und ANA- Patienten ergab hier allerdings einen deutlich auffälligeren Unterschied. ANA+ Oligo- oder Polyarthritispatienten wiesen einen sehr signifikant höheren Anteil IL-21+ T-Zellen auf als die entsprechende ANA- Gruppe (ANA-  $2,9 \pm 2,1$  % vs. ANA+  $12,7 \pm 10,2$  %;  $p = 0,004$ ; Abbildung 8 B). Auch der Anteil IL-21 und IFN- $\gamma$  koexprimierender T-Zellen waren bei ANA+ Patienten mit  $9,4 \pm 9,5$  % aller CD4+CD45RO+ Zellen signifikant höher als bei ANA- Patienten ( $2,0 \pm 1,6$  %;  $p = 0,02$ ; Abbildung 8 C).



Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass sich das Zytokinmuster von T-Helferzellen zwischen den JIA-Subgruppen unterscheidet und dass insbesondere IL-21 ein Signatur-Zytokin von T-Helferzellen bei ANA+ JIA-Patienten zu sein scheint.



**Abbildung 7: Erhöhter Anteil IL-17 produzierender T-Zellen in der Synovialflüssigkeit von EAA-Patienten.** **A** Repräsentative Kontur-Plots zeigen beispielhaft die Expression von IL-17 und IFN- $\gamma$  von CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen in der Synovialflüssigkeit von 5 JIA-Patienten. **B, C, D** Prozentualer Anteil IL-17 produzierender Zellen, sowie IL-17+IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> und IL-17+IFN- $\gamma$ <sup>-</sup> Zellen an allen CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> Zellen in der Synovialflüssigkeit verglichen zwischen EAA- (n = 7), Oligoarthritis- (n = 28) und Polyarthritispatienten (n = 6). Innerhalb der kombinierten Oligo- und Polyarthritissgruppe wurden zudem ANA+ (n = 19) mit ANA- (n = 11) Patienten verglichen. Von diesem Teil der Analyse wurden Patienten mit grenzwertigem ANA-Titer von 1:80 (n = 4) ausgeschlossen. Säulen mit Fehlerbalken zeigen Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, Einzelwerte sind als Punkte dargestellt; ungepaarter t-Test.



**Abbildung 8: Erhöhter Anteil IL-21 produzierender T-Zellen in der Synovialflüssigkeit von ANA+ Oligo-/Polyarthritispatienten.** **A** Repräsentative Kontur-Plots zeigen beispielhaft die Expression von IL-21 und IFN- $\gamma$  von CD4+CD45RO+ T-Zellen in der Synovialflüssigkeit von 5 JIA-Patienten. **B, C, D** Prozentualer Anteil IL-21 produzierender Zellen, sowie IL-21+IFN- $\gamma$ + und IL-21+IFN- $\gamma$ - Zellen an allen CD4+CD45RO+ Zellen in der Synovialflüssigkeit verglichen zwischen EAA- (n = 7), Oligoarthritis- (n = 28) und Polyarthritispatienten (n = 6). Innerhalb der kombinierten Oligo- und Polyarthritiss-Gruppe wurden zudem ANA+ ( $\geq 1:160$ ; n = 19) mit ANA- ( $\leq 1:40$ ; n = 11) Patienten verglichen. Von diesem Teil der Analyse wurden Patienten mit grenzwertigem ANA-Titer von 1:80 (n = 4) ausgeschlossen. Säulen mit Fehlerbalken zeigen Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, Einzelwerte sind als Punkte dargestellt; ungepaarter t-Test.

### 3.2 Expression von PD-1 charakterisiert eine Subpopulation von Gedächtnis-T-Zellen in der Synovialflüssigkeit von JIA-Patienten

In verschiedenen systemischen Autoimmunerkrankungen wie dem systemischen Lupus Erythematoses, dem Sjögren-Syndrom und der rheumatoiden Arthritis konnte eine Expansion von sogenannten peripheren T-Helferzellen im Blut der Patienten nachgewiesen werden (75, 85). Diese exprimieren, wie folliculäre T-Helferzellen sekundär lymphatischer Organe, IL-21 und PD-1, scheinen sich von diesen jedoch hinsichtlich ihrer Expression von Transkriptionsfaktoren, Zytokinen und Chemokinrezeptoren teilweise zu unterscheiden. Daher verwendeten wir im Rahmen dieser Arbeit PD-1 als hinweisgebenden Marker für potenzielle „B-Zell-Helfer“-T-Zellen in den betroffenen Gelenken von JIA-Patienten.

In einer Kohorte von 12 Patienten, von welchen gepaarte Blut- und Synovialflüssigkeitsproben zur Verfügung standen, konnte in der Synovialflüssigkeit eine Expansion von PD-1<sup>hi</sup> Zellen innerhalb des T-Helferzell-Kompartiments festgestellt werden. Wie Abbildung 9 zeigt, machte diese Population 22,93 ± 13,95 % der CD4<sup>+</sup> Zellen der Synovialflüssigkeit aus, während sie weder im Blut der Patienten noch dem gesunder Kontrollen zu finden war (PB JIA 2,20 ± 2,13 % und PB Kontrolle 0,92 ± 0,66 %).

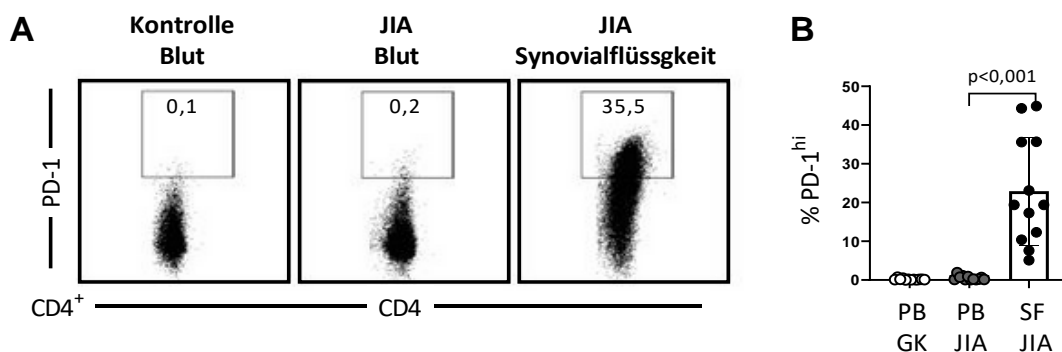


Abbildung 9: PD1<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen ließen sich in der Synovialflüssigkeit von JIA-Patienten, jedoch nicht im peripheren Blut nachweisen. **A** Repräsentative Dotplots zeigen die durchflusszytometrische Analyse der PD-1 Expression auf CD4<sup>+</sup> Zellen im Blut einer gesunden Kontrolle, sowie in PB und SF eines JIA-Patienten. **B** Prozentualer Anteil PD-1<sup>hi</sup> T-Helferzellen im PB gesunder Kontrollen (GK, n=12, ungepaarter t-Test), sowie in gepaarten PB- und SF-Proben von JIA-Patienten (n=12, gepaarter t-Test). Säulen und Fehlerbalken zeigen Mittelwert und Standardabweichung, Einzelwerte als Kreise dargestellt.

### 3.2.1 Verteilung von PD1<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup> innerhalb der T-Zell-Subklassen

Innerhalb der PD-1<sup>lo/-</sup> und PD-1<sup>hi</sup> T-Zellen der SF wurde anhand der Expression von CCR7 und CD45RO bestimmt, zu welchen T-Zell-Subgruppen sich die Zellen jeweils zuordnen lassen. Abbildung 10 zeigt, dass innerhalb der PD-1<sup>lo/-</sup> Zellen des Gelenks CD45RO<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen vorherrschten, welche sich zu etwa gleichen Teilen in CCR7<sup>+</sup> Zentrale T-Gedächtniszellen (T<sub>CM</sub>) (44,52 ± 21,62 %) und CCR7<sup>-</sup> Effektor-T-Gedächtniszellen (T<sub>EM</sub>) (49,60 ± 20,15 %) aufteilten. Nur ein geringer Teil waren naive T-Zellen. Bei den PD-1<sup>hi</sup> Zellen hingegen fanden sich ausschließlich CD45RO<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen, unter welchen wiederum CCR7<sup>-</sup> T<sub>EM</sub> Zellen den größten Anteil bildeten (82,8 ± 12,5 %).

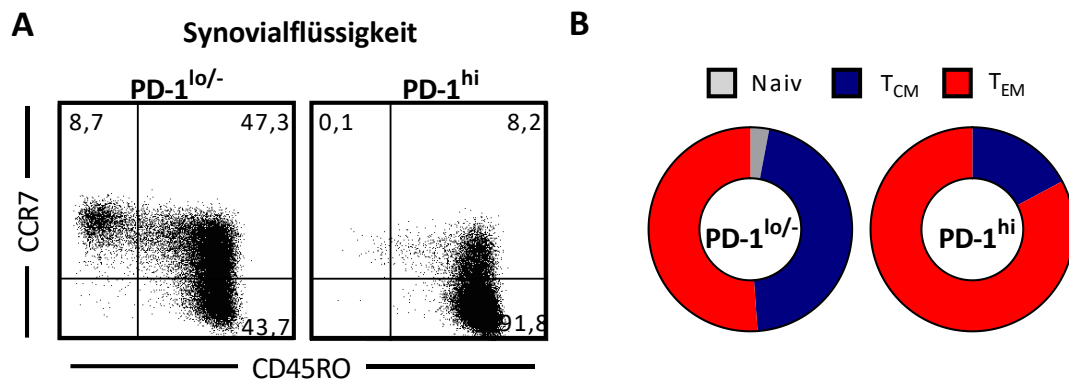


Abbildung 10: Auftreten von PD-1<sup>lo/-</sup> und PD-1<sup>hi</sup> Zellen innerhalb der T-Zell-Subklassen. A Exemplarische Dotplots zeigen PD-1<sup>lo/-</sup> und PD-1<sup>hi</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen der SF eines JIA-Patienten. Die Gates unterteilen die Zellpopulation in CCR7<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> Zentrale T-Gedächtniszellen (T<sub>CM</sub>), CCR7<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup> Effektor-T-Gedächtniszellen (T<sub>EM</sub>) und CD45RO<sup>-</sup> naive T-Zellen. B Der durchschnittliche Anteil der in A dargestellten Subklassen innerhalb der PD-1<sup>lo/-</sup> und PD-1<sup>hi</sup> CD4<sup>+</sup> Population in der untersuchten Stichprobe (n = 6) ist in Kreisdiagrammen gezeigt.

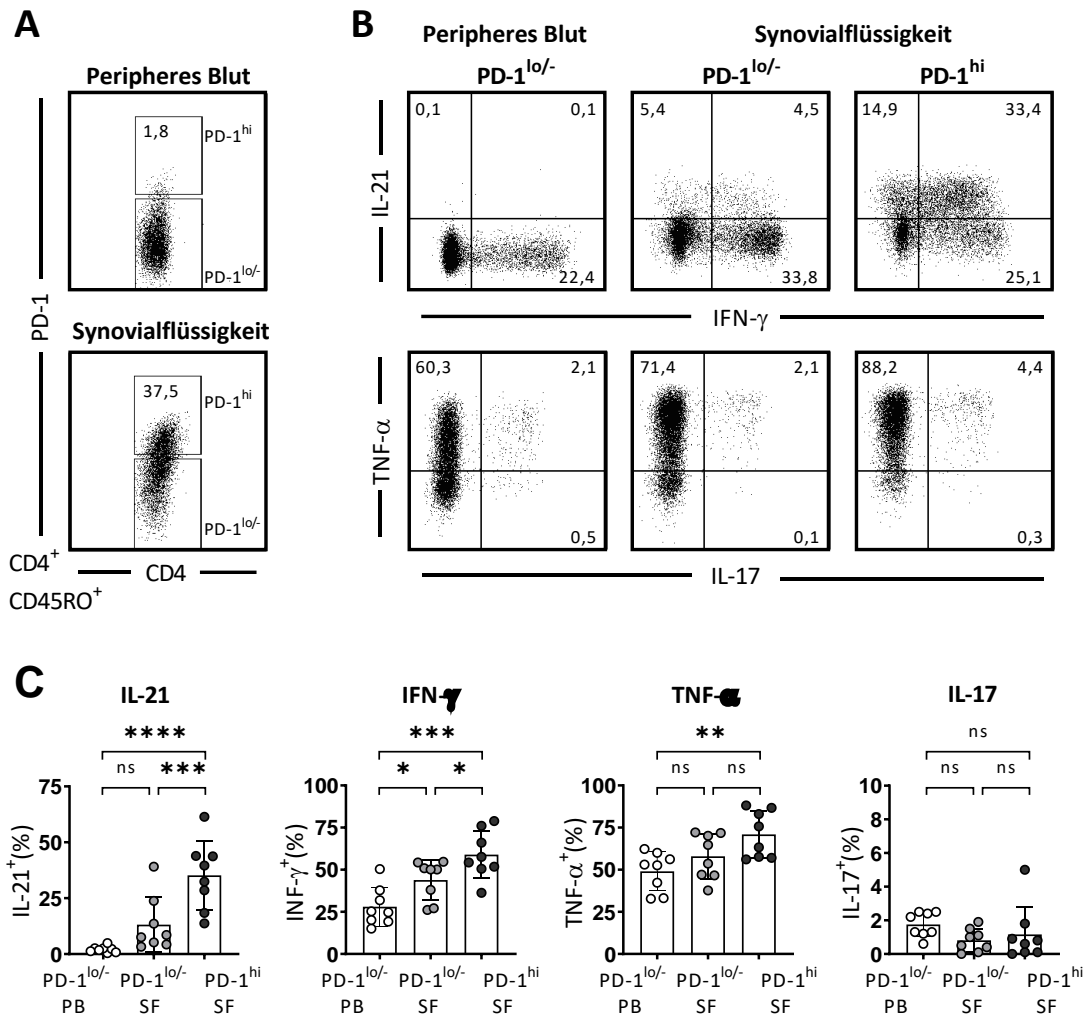
### 3.2.2 PD-1<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup> der Synovialflüssigkeit zeichnen sich durch Koexpression von IL-21 und IFN- $\gamma$ aus

Eine hohe Expression von PD-1 wird oft als Zeichen eines Erschöpfungszustandes von T-Zellen gesehen (85). Daher testeten wir die Fähigkeit von PD-1<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen zur Zytokinproduktion auf Stimulation und verglichen diese zu PD-1<sup>lo/-</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen der Synovialflüssigkeit und des Blutes in gematchten Proben von 8 JIA-Patienten. Besonderen Fokus legten wir dabei auf das Signatur-Zytokin von T<sub>FH</sub>-Zellen, IL-21. Während sich die PD-1<sup>lo/-</sup> Fraktionen des peripheren Blutes und der Synovialflüssigkeit nicht signifikant hinsichtlich ihrer Expression von IL-21 unterschieden (PB PD-1<sup>lo/-</sup> 2,1 ± 1,4 % vs. SF PD-1<sup>lo/-</sup> 13,2

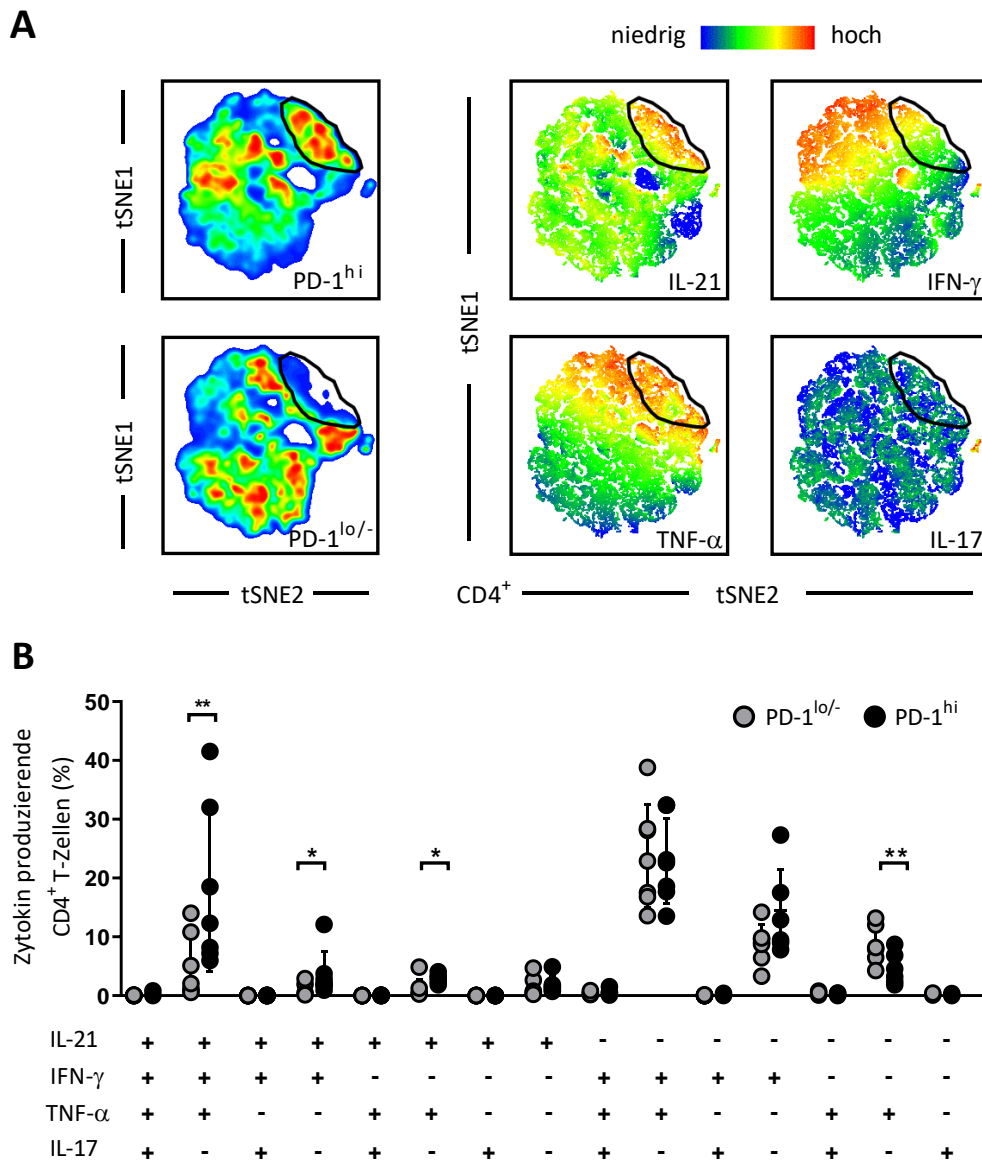
$\pm 12,4 \%$ ,  $p = 0,07$ ), fielen PD-1<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen der Synovialflüssigkeit durch einen gegenüber der PD-1<sup>lo/-</sup> Population deutlich erhöhten Anteil von  $35,2 \pm 15,4 \%$  IL-21<sup>+</sup> Zellen auf ( $p < 0,001$ ) (Abbildung 11 C).

Im weiteren Vergleich zeigten PD-1<sup>hi</sup> T-Zellen außerdem eine hohe Expression der proinflammatorischen, für T<sub>H</sub>1-Zellen charakteristischen Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . PD-1<sup>hi</sup> Zellen der Synovialflüssigkeit waren zu  $58,9 \pm 14,1 \%$  IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> und zu  $70,99 \pm 14,00 \%$  TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> während PD-1<sup>lo/-</sup> Zellen zu  $43,9 \pm 11,9 \%$  IFN- $\gamma$  ( $p = 0,04$  für PB vs. SF) und zu  $58,00 \pm 13,44 \%$  TNF- $\alpha$  ( $p = 0,08$  für PB vs. SF) bildeten. IL-17 wurde von allen drei Subgruppen in vergleichbarem Maße exprimiert (PB PD-1<sup>lo/-</sup>  $1,8 \pm 0,7 \%$  vs. SF PD-1<sup>lo/-</sup>  $0,8 \pm 0,7 \%$  vs. SF PD-1<sup>hi</sup>  $1,2 \pm 1,6 \%$ ;  $p = 0,23$ ; Abbildung 11 C).

Um die Analyse des Zytokinprofils zu verfeinern, nutzten wir wiederum den t-SNE-Algorithmus mit den kombinierten durchflusszytometrischen Zytokinexpressions-Daten der Synovialflüssigkeit von 5 JIA-Patienten. Dieser Ansatz konnte die bisherigen Ergebnisse, dass PD-1<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen der Synovialflüssigkeit eine gemischte Zytokin-Signatur aus „B-Helfer“-Zytokinen und T<sub>H</sub>1-Zytokinen aufweisen, untermauern. Innerhalb der manuell selektierten PD-1<sup>hi</sup> Population erbrachte die t-SNE-Analyse eine spezifische Population, welche sich insbesondere durch IL-21-Expression, sowie Koexpression von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , nicht jedoch IL-17 auszeichnete (Abbildung 12 A). Dies ließ sich auch auf Einzelzellebene nachvollziehen, indem anhand von Booleschen Gates polyfunktionale Zytokin-Kombinationen zwischen PD-1<sup>hi</sup> und PD-1<sup>lo/-</sup> Zellen 7 weiterer JIA-Patienten verglichen wurden (Abbildung 12 B). Das PD-1<sup>hi</sup> Kompartiment beinhaltete eine signifikant erhöhte Zahl CD4<sup>+</sup> Zellen, die IL-21, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , nicht jedoch IL-17 exprimierten ( $18,0 \pm 13,8 \%$  der PD-1<sup>hi</sup> vs.  $4,9 \pm 5,4 \%$  der PD-1<sup>lo/-</sup>;  $p < 0,01$ ; Abbildung 12 B).



**Abbildung 11: Vergleich des Zytokinprofils von PD-1<sup>lo/-</sup> CD4<sup>+</sup> versus PD-1<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen.** **A, B** Repräsentative Dotplots zeigen beispielhaft die durchflusszytometrische Analyse der Zytokinexpression von PD-1<sup>lo/-</sup> T-Zellen des peripheren Blutes (PB), sowie PD-1<sup>lo/-</sup> und PD-1<sup>hi</sup> T-Zellen der Synovialflüssigkeit (SF) eines JIA-Patienten nach Stimulation *in vitro* mithilfe von SEB. Oberflächen- und intrazelluläre Färbung. **C** Balkendiagramme zeigen den prozentualen Anteil Zytokin-exprimierender Zellen in gematchten PB- und SF-Proben von 8 JIA-Patienten. Die Kreise repräsentieren einzelne Patientenproben, Säulen und Fehlerbalken zeigen Mittelwert und Standardabweichung der Stichprobe. Einfaktorische ANOVA für gepaarte Stichproben mit Tukey-Test für multiple Vergleiche. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001.



**Abbildung 12: Detaillierte Analyse des Zytokinprofils synovialer PD-1<sup>hi</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen.** **A** t-SNE-Plots von PD-1<sup>hi</sup> und PD-1<sup>lo/-</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen aus zusammengeführten Daten von 5 JIA-Patienten. In der linken Spalte sind die kombinierten Expressionsdaten von IL-21, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-17 von manuell gateden CD4<sup>+</sup> Zellen gezeigt, geteilt in PD-1<sup>hi</sup> (oben) und PD-1<sup>lo/-</sup> (unten) Zellen. Eine für PD-1<sup>hi</sup> Zellen als spezifisch erkannte Population ist umrandet. In der mittleren und linken Spalte sind t-SNE-Plots des gleichen Datensatzes nach Zytokinen getrennt als Heatmap dargestellt. Die Farben geben die Expressionslevel der einzelnen Zytokine wieder. **B** Durchflusszytometrisch bestimmte, polyfunktionale Expressionsdaten synovialer PD-1<sup>hi</sup> vs. PD-1<sup>lo/-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen von 7 weiteren JIA-Patienten wurden mittels Boolescher Gates analysiert. Einzelwerte sind als Kreise dargestellt, waagrechte und senkrechte Linien geben Mittelwert und Standardabweichung an. Gepaarter t-Test; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

### 3.3 Phänotypischer Vergleich PD-1<sup>hi</sup> T<sub>PH</sub> der Synovialflüssigkeit und T<sub>FH</sub> der Tonsille

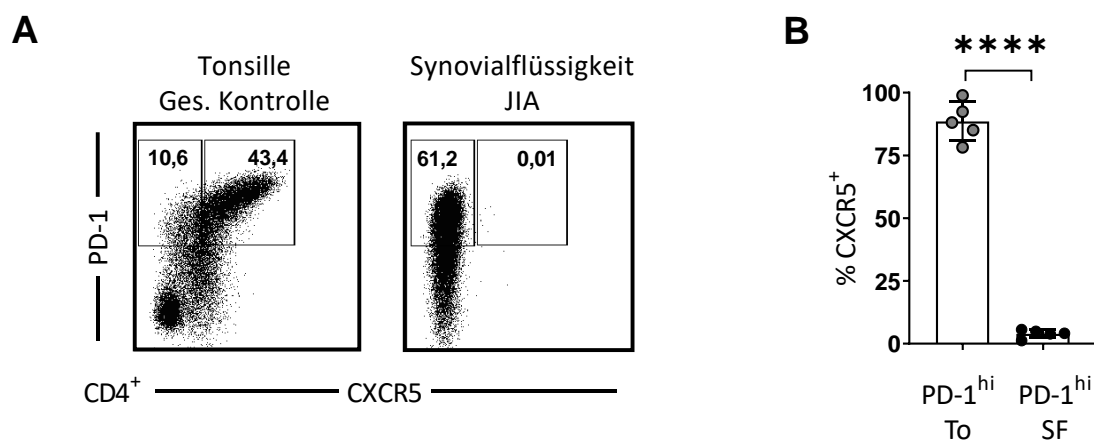
Weiterhin gingen wir der Frage nach, ob die PD1<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen der Synovialflüssigkeit phänotypische Ähnlichkeit mit T<sub>FH</sub> der humanen Tonsille besitzen. Hierzu wurden PD-1<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Tonsillen 5 gesunder Spender und der Synovialflüssigkeit von 5 JIA-Patienten durchflusszytometrisch untersucht und hinsichtlich ihres Repertoires von Chemokinrezeptoren, Transkriptionsfaktoren sowie Differenzierungs- und Aktivierungsmarkern untersucht (Abbildung 14 A). Die Färbungen und Messungen wurden wiederum simultan durchgeführt, um das Risiko einer Verfälschung der Hauptkomponentenanalyse durch tagesabhängige Schwankungen zu minimieren.

Insbesondere der Chemokinrezeptor CXCR5, welcher neben PD-1 vielfach zur Charakterisierung von TFH verwendet wird und in den meisten tonsillären PD-1<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen in hohem Maße vorhanden war ( $88,5 \pm 7,8 \%$ ), wurde von den PD-1<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen der Synovialflüssigkeit nicht exprimiert ( $3,9 \pm 1,7 \%$ ;  $p < 0,01$ ) (Abbildung 13). Daher nahmen wir an, dass es sich zwar bei den CD4<sup>+</sup> Zellen mit hoher Expression von PD-1 um eine CXCR5-negative B-Helfer-T-Zell-Population handeln könnte, welche sich jedoch phänotypisch deutlich von den T<sub>FH</sub> der Tonsille unterscheidet. In der Tat waren auch in der ausführlicheren durchflusszytometrischen Analyse der Chemokinrezeptoren, Transkriptionsfaktoren, Differenzierungs- und Aktivierungsmarker die synovialen PD-1<sup>hi</sup> Zellen eindeutig von der tonsillären PD-1<sup>hi</sup> Population zu unterscheiden, wie Abbildung 14, zusammengefasst als hierarchische Cluster- und Hauptkomponentenanalyse, zeigt.

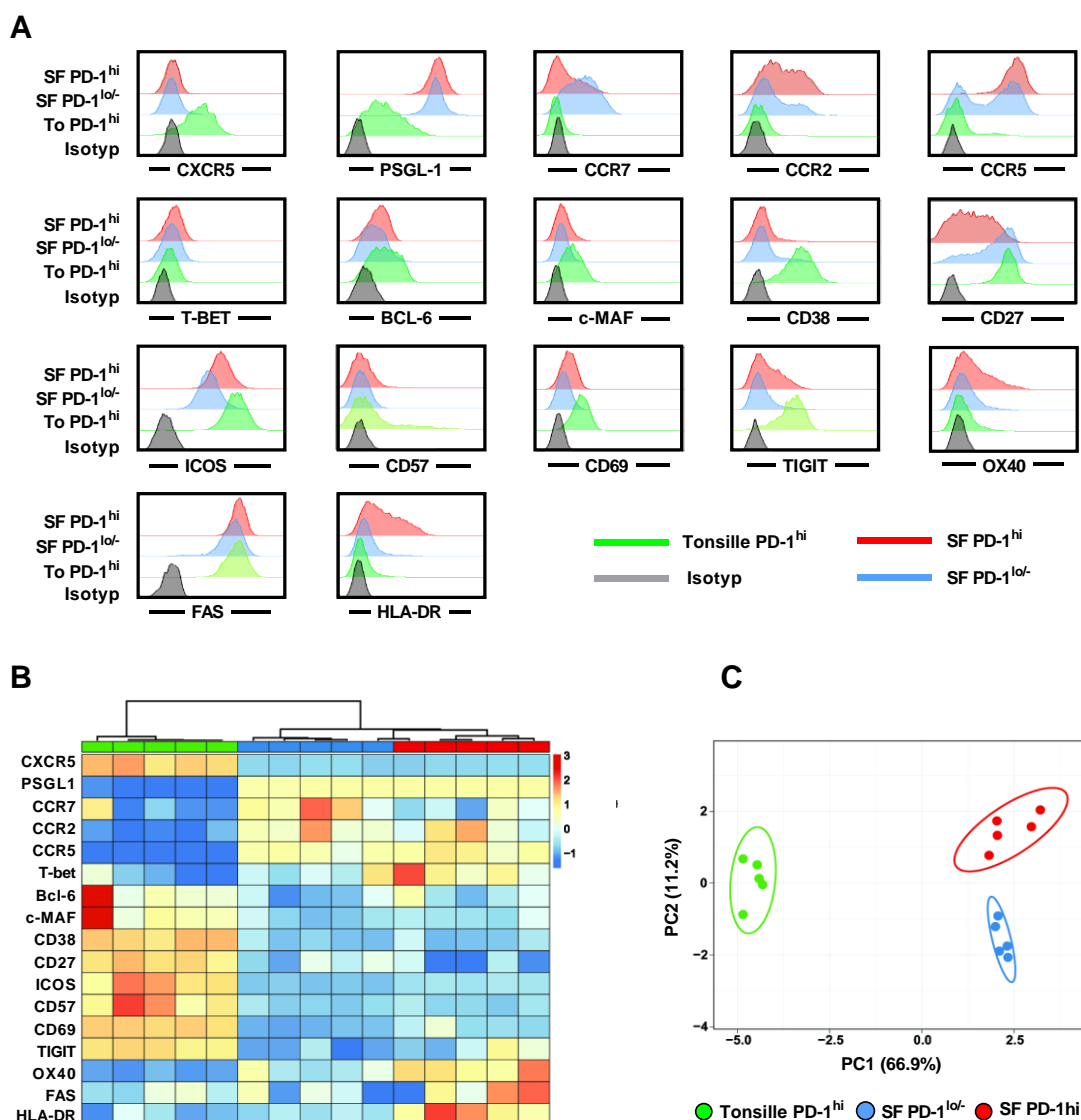
Die die T<sub>FH</sub>-Linie definierenden Transkriptionsfaktoren Bcl-6, c-MAF sowie ICOS wurden in PD-1<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup> der Synovialflüssigkeit ebenfalls in geringerem Maße exprimiert. Die MFI von BCL-6 betrug bei den PD-1<sup>hi</sup> T-Zellen der Tonsille durchschnittlich  $303 \pm 122$ , bei PD-1<sup>hi</sup> T-Zellen der Synovialflüssigkeit hingegen  $189 \pm 58$  ( $p = 0,13$ ; Einfaktorielle ANOVA mit Tukey-Korrektur). Die MFI von ICOS (Tonsille  $14156 \pm 2652$  vs. SF  $4260 \pm 342$ ;  $p < 0,0001$ ) und c-MAF (Tonsille  $170 \pm 64$  vs. SF  $83 \pm 20$ ;  $p < 0,05$ ) unterschieden sich hingegen noch deutlicher zwischen den tonsillären und synovialen PD-1<sup>hi</sup> T-Helferzellen.



Stattdessen zeigten PD-1<sup>hi</sup> T-Zellen der Synovialflüssigkeit mehr phänotypische Ähnlichkeit mit der PD-1<sup>lo/-</sup> Population auf. Beide Zellpopulationen der Synovialflüssigkeit wiesen zum Teil typische Merkmale von T<sub>H</sub>1-Zellen auf, unter anderem CCR5 (PD-1<sup>hi</sup> 82,6 ± 10,0 % vs. PD-1<sup>lo/-</sup> 64,3 ± 13,1 %; p < 0,05) und den T<sub>H</sub>1-Transkriptionsfaktor T-bet (MFI PD-1<sup>hi</sup> 149 ± 21 vs. PD-1<sup>lo/-</sup> 120 ± 21 %; p = 0,11). Allerdings grenzten sich synoviale PD-1<sup>hi</sup> Zellen durch eine deutlich höhere Expression von OX40 (Tonsille PD-1<sup>hi</sup> 23,4 ± 5,2 % vs. SF PD-1<sup>hi</sup> 36,6 ± 6,5 % vs. SF PD-1<sup>lo/-</sup> 12,3 ± 6,7 %; p < 0,001; einfaktorielles ANOVA mit Tukey-Test) und HLA-DR (Tonsille PD-1<sup>hi</sup> 5,5 ± 5,9 % vs. SF PD-1<sup>hi</sup> 32,7 ± 8,8 % vs. SF PD-1<sup>lo/-</sup> 6,8 ± 1,4 %; p < 0,0001) als T<sub>FH</sub> und SF PD-1<sup>lo/-</sup> ab. In der Hauptkomponentenanalyse (Abbildung 14 C) zeigten sich somit alle drei untersuchten Populationen deutlich voneinander separiert.



**Abbildung 13: CXCR5-Expression von PD-1<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen der Tonsille und der Synovialflüssigkeit.** **A** Exemplarische Dotplots der durchflusszytometrischen Untersuchung CD4<sup>+</sup> Zellen aus der Tonsille eines gesunden Spenders und der Synovialflüssigkeit eines JIA-Patienten. **B** Prozentualer Anteil CXCR5-exprimierender Zellen an allen PD-1<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen der Tonsille (n=4) und der Synovialflüssigkeit (n=5). Die Säulen mit Fehlerbalken zeigen Mittelwert und Standardabweichung der Stichprobe. Ungepaarter t-Test; \*\*\*\* p<0,0001

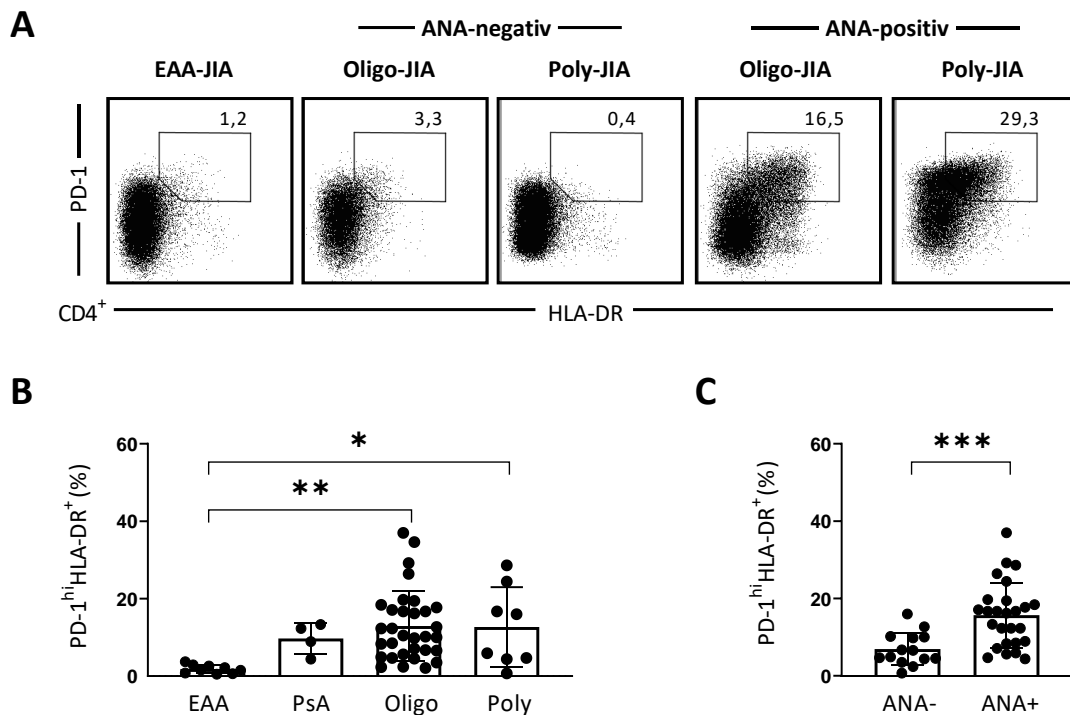


**Abbildung 14: Phänotypischer Vergleich von PD-1<sup>hi</sup> und SF PD-1<sup>lo/-</sup> der Synovialflüssigkeit, sowie T<sub>FH</sub> der Tonsille. A** Repräsentative Histogramme zeigen beispielhaft die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) verschiedener Transkriptionsfaktoren und Oberflächenmarker verglichen zwischen PD-1<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup> (rote Kurve) und PD-1<sup>lo/-</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen (blaue Kurve) der Synovialflüssigkeit eines JIA-Patienten und PD-1<sup>hi</sup> T<sub>FH</sub> der Tonsille (To) eines gesunden Spenders (grüne Kurve). Als graue Kurve ist die Isotypen-Kontrolle mithilfe einer ungefärbten Zellprobe dargestellt. **B** Hierarchische Cluster-Analyse der in A dargestellten Untersuchung an 5 Tonsillen (erste Zeile grün), sowie PD-1<sup>hi</sup> (erste Zeile rot) und PD-1<sup>lo/-</sup> (erste Zeile blau) von 5 JIA-Patienten. MFI oder prozentualer Anteil positiver Zellen dargestellt als Heatmap von blau (niedrig) nach rot (hoch) mit zeilenweiser Normalisierung der Daten. Zusätzlich ist die Cluster-Hierarchie als Baumdiagramm gezeigt. **C** Hauptkomponentenanalyse der in B dargestellten Zellpopulationen und Marker.

### 3.4 Expansion von PD-1<sup>hi</sup>HLA-DR<sup>+</sup> T-Zellen vermehrt bei ANA<sup>+</sup> JIA-Patienten

Nachdem also in den vorausgehenden Untersuchungen eine Gedächtnis-T-Zell-Population identifiziert werden konnte, welche spezifisch in Inflammationsgebieten von JIA-

Patienten aufzutreten scheint und sich besonders durch hohe Expression von PD-1 und HLA-DR abhebt, wurde einem weiteren Schritt das Auftreten dieser Zellpopulation in den jeweiligen JIA-Subgruppen an einer größeren Kohorte von 53 JIA-Patienten analysiert (Tabelle 2).



**Abbildung 15: Anteil PD-1<sup>hi</sup>HLA-DR<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen innerhalb der JIA-Subgruppen und in Abhängigkeit vom ANA-Status. A** Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse der PD-1 und HLA-DR Expression von CD4<sup>+</sup> Zellen innerhalb der untersuchten JIA-Subgruppen. **B** Anteil an PD-1<sup>hi</sup>HLA-DR<sup>+</sup> Zellen an allen CD4<sup>+</sup> T-Zellen, verglichen zwischen Enthesitis-assoziiierter Arthritis (EAA) (n=9), Psoriasis-Arthritis (PsA) (n=4), Oligoarthritis (n=32) und Polyarthritis (n=8). **C** Anteil an PD-1<sup>hi</sup>HLA-DR<sup>+</sup> Zellen an allen CD4<sup>+</sup> T-Zellen verglichen zwischen 26 ANA+ (≥ 1:160) und 14 ANA- (≤ 1:40) Patienten innerhalb der Oligo- Poly- und Psoriasisarthritisgruppe. Ausschluss von 4 JIA-Patienten mit grenzwertig positivem ANA-Titer von 1:80. Punkte repräsentieren einzelne Patientenproben, Säulen und Fehlerbalken zeigen Mittelwert und Standardabweichung der Stichprobe; Einfaktorielle ANOVA mit Tukey-Test für multiple Vergleiche (B); ungepaarter t-Test (C), \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

Der Anteil an PD-1<sup>hi</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen unterschied sich hierbei nicht signifikant zwischen Psoriasis-Arthritis (9,7 ± 4,0 %), Oligoarthritis (12,9 ± 9,1 %) und Polyarthritis (12,7 ± 10,3 %) (p = 0,84). Bei EAA-Patienten waren hingegen nahezu keine PD-1<sup>hi</sup>HLA-DR<sup>+</sup> Zellen nachweisbar (1,8 ± 1,1 %) (Abbildung 15 B). Beim Vergleich von ANA+ mit ANA- Patienten innerhalb der kombinierten Gruppen der Oligo- Poly- und Psoriasisarthritis-

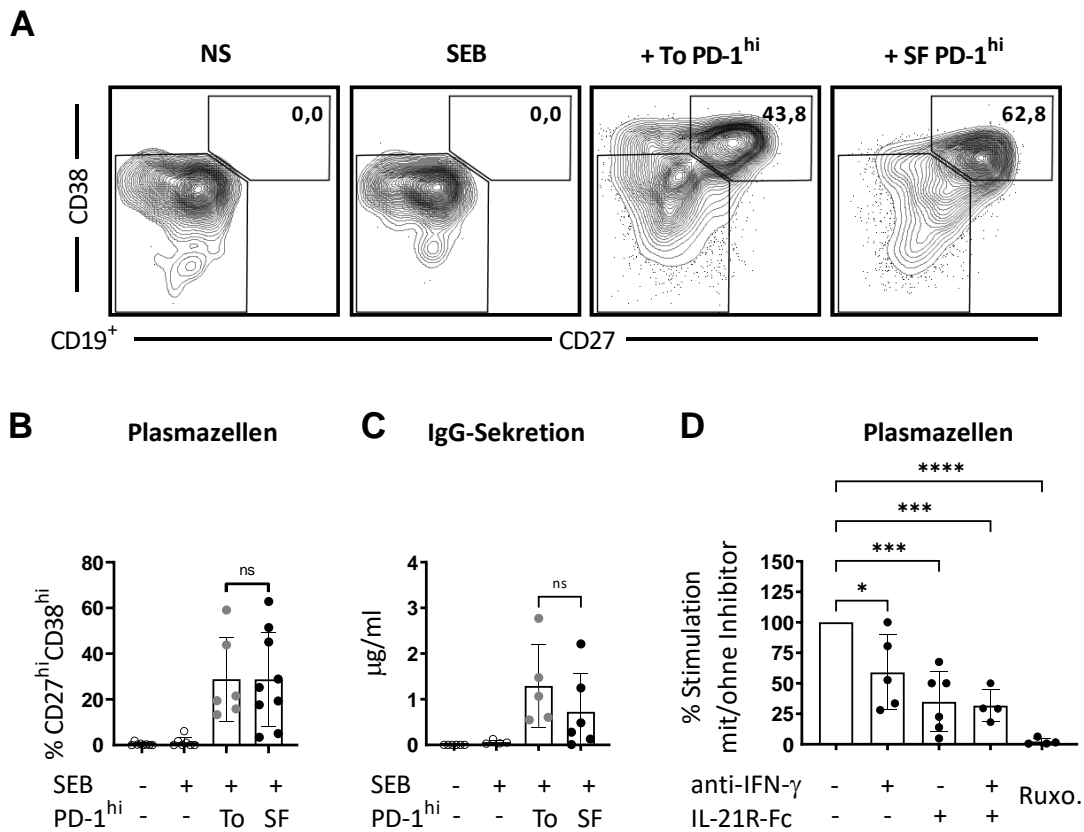
Patienten fiel allerdings bei ANA+ Patienten ein hochsignifikant höherer Anteil dieser Zellpopulation auf (ANA-  $6,9 \pm 4,3$  % vs. ANA+  $15,6 \pm 8,4$  %,  $p < 0,001$ ) (Abbildung 15 C). Für diesen Teil der Analyse wurden wiederum 4 Patienten mit grenzwertigem ANA-Titer von 1:80 ausgeschlossen.

### 3.5 Funktionelle Analyse von PD-1<sup>hi</sup> T<sub>PH</sub> der Synovialflüssigkeit und T<sub>FH</sub>

#### 3.5.1 T<sub>PH</sub> und T<sub>FH</sub> leisten B-Zell-Hilfe und induzieren Plasmazellen

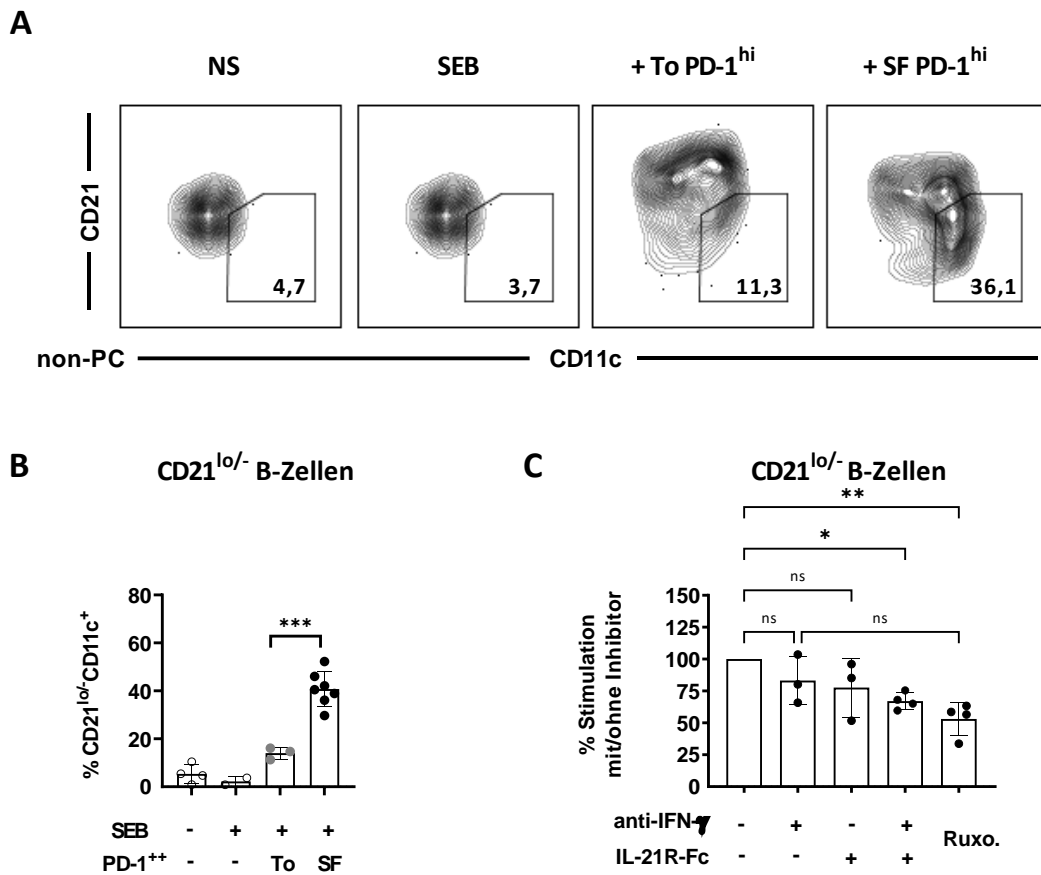
Aus dem durch IL-21 geprägten Zytokinmuster der PD-1<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup> der SF ergab sich die Frage, ob diese Zellen trotz ihrer phänotypischen Unterschiede funktionelle Überschneidung zu T<sub>FH</sub> der Tonsille aufweisen, insbesondere, ob sie zur B-Zell-Hilfe und Induktion von Plasmazellen in der Lage sind. Hierzu führten wir *in vitro* Aktivierungs-Assays mit FACS-sortierten PD-1<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen der Tonsille und der Synovialflüssigkeit mit CD27+IgM<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen von gesunden Spendern unter Zugabe von Staphylokokken-Enterotoxin B durch.

Die PD-1<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen der Synovialflüssigkeit zeigten in diesem Ansatz eine ähnliche Fähigkeit zur Plasmazellinduktion und Immunglobulinsekretion wie die klassischen T<sub>FH</sub> der Tonsille. Nach 5 Tagen zeigten  $28,8 \pm 18,4$  % (Tonsille) bzw.  $28,8 \pm 20,5$  % (SF) der B-Zellen eine hohe Koexpression von CD27 und CD38. Um den individuellen Beitrag von IFN- $\gamma$  und IL-21 auf die Plasmazellentstehung zu untersuchen, wurden zusätzlich diese Zytokine einzeln und in Kombination blockiert. Die Blockade von IL-21 mittels rekombinanten löslichem IL-21-Rezeptor-Fc (IL-21R-Fc) hatte einen stärkeren hemmenden Effekt als die Blockade von IFN- $\gamma$ . Während die IFN- $\gamma$ -Blockade die Plasmazellinduktion auf  $59,0 \pm 30,8$  % des Referenzwertes reduzierte, entstanden nach Blockade von IL-21 nur noch  $34,8 \pm 24,6$  % der Plasmazellen im Vergleich zur Referenzprobe ohne Inhibition ( $p < 0,001$  für IL-21R-Fc vs. Referenzprobe). Jedoch konnte auch die kombinierte Blockade beider Zytokine die Plasmazellentstehung nicht vollständig unterdrücken. Dies gelang nur durch Blockade des JAK/STAT-Signalwegs mithilfe von Ruxolitinib, eines Inhibitors der Janus-assoziierten Kinasen (JAK) 1 und 2 ( $2,3 \pm 2,7$  % des Referenzwertes;  $p < 0,0001$ ) (Abbildung 16).



**Abbildung 16: Induktion von Plasmazelldifferenzierung durch tonsilläre und synoviale PD-1<sup>hi</sup> T-Zellen.** A *In vitro* Kokultur-Experiment mit FACS-sortierten CD19+CD27+IgM- klassengewechselten B-Gedächtniszellen gesunder Kontrollen mit PD-1<sup>hi</sup> T-Zellen der Synovialflüssigkeit von JIA-Patienten oder der Tonsille. Exemplarische Konturplots zeigen die Plasmazelldifferenzierung (CD27<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>) nach 5 Tagen in der unstimulierten Probe (NS), mit Stimulation durch SEB alleine (SEB) sowie in Anwesenheit von PD-1<sup>hi</sup> T-Zellen der Tonsille (To) oder der Synovialflüssigkeit (SF) B Prozentualer Anteil von CD27<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> Plasmablasten an allen CD19+ B-Zellen nach 5 Tagen aus 6 Einzelexperimenten (6 Tonsillen, 9 JIA-Patienten). C Immunglobulinkonzentration in Zellüberständen nach 5 Tagen aus 5 Einzelexperimenten (5 Tonsillen, 6 JIA-Patienten) in µg/ml. D Kokultur wie in A beschrieben unter einzelner und kombinierter Blockade von IFN- $\gamma$  (anti-IFN- $\gamma$ ) und IL-21 (IL-21R-Fc), sowie unter Blockade des JAK/STAT-Signalweges durch Ruxolitinib (Ruxo). 100% entsprechen der Probe ohne Blockade. n=6 Einzelversuche B-D Die Säulen mit Fehlerbalken zeigen Mittelwerte und Standardabweichung. Ungepaarter t-Test (B, C) bzw. Einfaktorielle ANOVA mit Tukey-Test für multiple Vergleiche (D); \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001.

### 3.5.2 Vermehrte Induktion atypischer CD21<sup>lo</sup>-T-bet+CD11c+ B-Zellen durch PD-1<sup>hi</sup> T<sub>PH</sub> der Synovialflüssigkeit ist abhängig von IL-21 und INF- $\gamma$



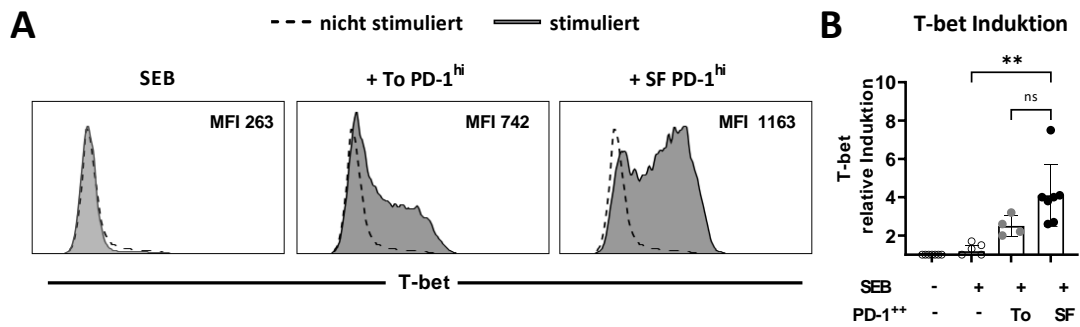
**Abbildung 17: Induktion eines CD21<sup>lo</sup>-CD11c+ B-Zell-Phänotyps durch SF PD-1<sup>hi</sup>.** **A** Kokultur-Experiment mit CD19+CD27+IgM- B-Gedächtniszellen und PD-1<sup>hi</sup> T-Zellen, wie in Abbildung 16 beschrieben. Exemplarische Konturplots zeigen die Expression von CD21 und CD11c nach 5 Tagen in der unstimulierten Probe (NS), mit Stimulation durch SEB alleine (SEB) sowie in Anwesenheit von PD-1<sup>hi</sup> T-Zellen der Tonsille (To) oder der Synovialflüssigkeit (SF) **B** Prozentualer Anteil CD21<sup>lo</sup>-CD11c+ Zellen nach 5 Tagen als Säulendiagramm. Kombinierte Daten aus 3 Einzelversuchen mit insgesamt 7 JIA-Patienten und 5 Tonsillen **C** Prozentualer Anteil CD21<sup>lo</sup>-CD11c+ Zellen nach 5-tägiger Kokultur von B-Gedächtniszellen und PD-1<sup>hi</sup> der Synovialflüssigkeit ohne Blockade und unter einzelner und kombinierter Blockade durch anti-IFN- $\gamma$  und/oder IL-21R-Fc, sowie unter Blockade des JAK/STAT-Signalweges durch Ruxolitinib. 100% entsprechen der Probe ohne Blockade. **B, C** Die Säulen mit Fehlerbalken geben den Mittelwert und die Standardabweichung an. Ungepaarter t-Test (B) bzw. Einfaktorielle ANOVA mit Tukey-Test für multiple Vergleiche (C); \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001.

Zusätzlich zur Plasmazelldifferenzierung konnte jedoch noch ein weiterer Effekt der synovialen PD-1<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen auf B-Zellen *in vitro* beobachtet werden, welcher durch tonsilläre T<sub>FH</sub> in bedeutend geringerem Maße auftrat. Nach 5-tägiger Kokultur von PD-1<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen und B-Zellen hatten mehr als ein Drittel der B-Zellen einen CD21<sup>lo</sup>CD11c+

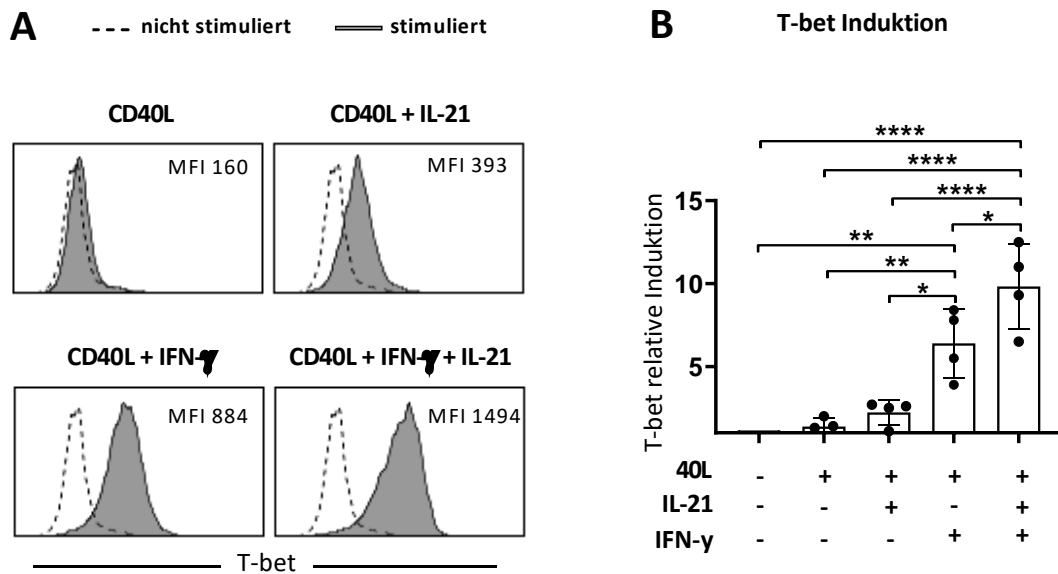
Phänotyp angenommen (Abbildung 17 A, B). Auch hier wurde der Einfluss von IL-21 und IFN- $\gamma$  auf die Entstehung dieses B-Zell-Phänotyps überprüft, indem diese Zytokine einzeln und in Kombination blockiert wurden. Die Blockade von IFN- $\gamma$  ( $p = 0,52$ ) oder IL-21 ( $p = 0,27$ ) allein hemmte die Differenzierung von CD21<sup>lo</sup>CD11c<sup>+</sup> nicht signifikant und auch die kombinierte Blockade hatte nur einen geringen, jedoch signifikanten hemmenden Effekt ( $p < 0,05$ ). Ruxolitinib konnte hingegen auch die Differenzierung von CD21<sup>lo</sup>CD11c<sup>+</sup> B-Zellen signifikant vermindern ( $p < 0,01$ ) (Abbildung 17 C).

CD21<sup>lo</sup>CD11c<sup>+</sup> B-Zellen wurden bereits in Assoziation mit diversen Autoimmun- und chronischen Inflammationsprozessen beschrieben und werden auch zur heterogenen Gruppe der sogenannten atypischen Memory B-Zellen (aMBC) gezählt (40, 43). Ein Teil dieser aMBC exprimiert den Transkriptionsfaktor T-bet (T-box expressed in T cells), wobei dessen Expression unter anderem durch die T<sub>FH</sub>-Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-21 reguliert wird (93). Daher untersuchten wir weiterhin, ob synoviale PD-1<sup>hi</sup> T-Zellen auch T-bet-Expression in B-Zellen *in vitro* induzieren. Im parallelen Kokultur-Experiment zeigten B-Zellen, welche mit PD-1<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Synovialflüssigkeit inkubiert wurden, eine um den Faktor  $4,1 \pm 1,6$  erhöhte Expression von T-bet im Vergleich zur nur durch SEB stimulierten Probe. Es zeigte sich somit eine tendenziell höhere Expression von T-bet als in den mit T<sub>FH</sub> der Tonsille inkubierten B-Zellen ( $2,5 \pm 0,5$  -fache Expression;  $p = 0,08$ ) (Abbildung 18).

Durch einen zusätzlichen B-Zell-Assay mit rekombinantem IL-21, IFN- $\gamma$  und CD40-Ligand (CD40-L) Stimulation konnte gezeigt werden, dass B-Zellen unter dem Einfluss von CD40-L und IFN- $\gamma$  eine signifikante T-bet-Expression zeigten ( $6,4 \pm 2,1$  -fache Expression im Vergleich zur unstimulierten Probe;  $p < 0,01$ ), wohingegen eine Stimulation durch CD40-L alleine zu keiner Induktion von T-bet führte ( $1,4 \pm 0,5$  -fache Expression im Vergleich zur unstimulierten Probe;  $p > 0,99$ ) (Abbildung 19). IL-21 hatte nur in Kombination mit CD40-L und IFN- $\gamma$  einen verstärkenden Effekt auf die T-bet-Induktion ( $9,8 \pm 2,6$  -fache Expression;  $p < 0,0001$ ).



**Abbildung 18: Induktion von T-bet-Expression in Gedächtnis-B-Zellen durch SF PD-1<sup>hi</sup>.** **A** T-/B-Zell Kokultur mit MACS-sortierten CD20<sup>+</sup> B-Zellen gesunder Kotrollen und PD-1<sup>hi</sup> T-Zellen der Synovialflüssigkeit von JIA-Patienten und der Tonsille. Histogramme zeigen beispielhaft die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von T-bet in CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> naiven B-Zellen in der unstimulierten Probe (gestrichelte Kurve), der B-Zell-Probe mit SEB und F(ab)<sub>2</sub>-anti-IgM allein und in Anwesenheit von PD-1<sup>hi</sup> T-Zellen der Tonsille oder der Synovialflüssigkeit (grau hinterlegte Kurven) nach 2 Tagen. **B** T-bet-Expression als Vielfaches der MFI in der nur durch SEB stimulierten Probe. Daten aus 3 Einzelversuchen mit insgesamt 4 Tonsillen und 7 JIA-Patienten. Säulen mit Fehlerbalken geben den Mittelwert und die Standardabweichung an. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Test für multiple Vergleiche; \*\*p<0,01.

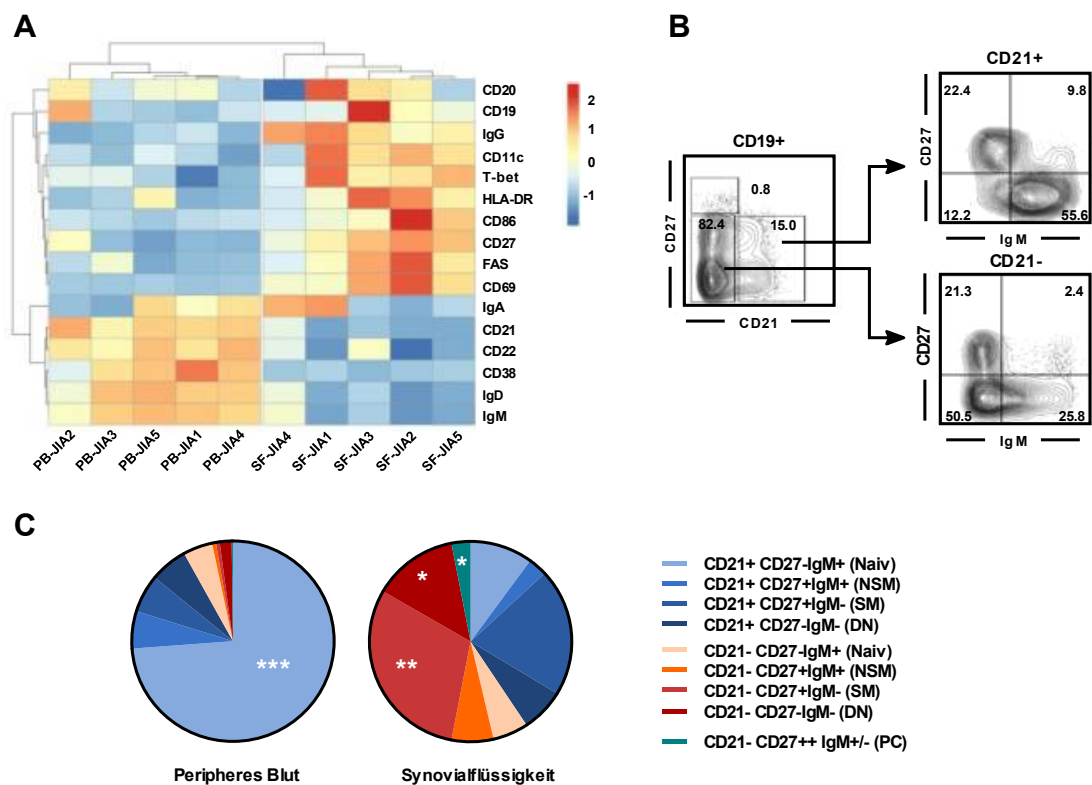


**Abbildung 19 Die Induktion von T-bet in B-Zellen ist abhängig von IL-21 und IFN- $\gamma$ .** **A** Repräsentative Histogramme zeigen beispielhaft ein Kultur-Experiment mit MACS-aufgereinigten CD20<sup>+</sup>-B-Zellen gesunder Spender. Die T-bet Expression wurde in CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> naiven B-Zellen analysiert. Stimulation allein durch CD40-L und unter Hinzugabe von rekombinantem IL-21 und/oder IFN- $\gamma$ ). **B** Durchschnittliche MFI als Vielfaches der unstimulierten B-Zell-Probe. n=4 Einzelexperimente. Die Säulen mit Fehlerbalken geben den Mittelwert und die Standardabweichung an. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001, Einfaktorielle ANOVA mit Tukey-Test für multiple Vergleiche.



### 3.6 Atypische CD21<sup>lo/-</sup>T-bet<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> B-Gedächtniszellen in ANA+ JIA-Patienten

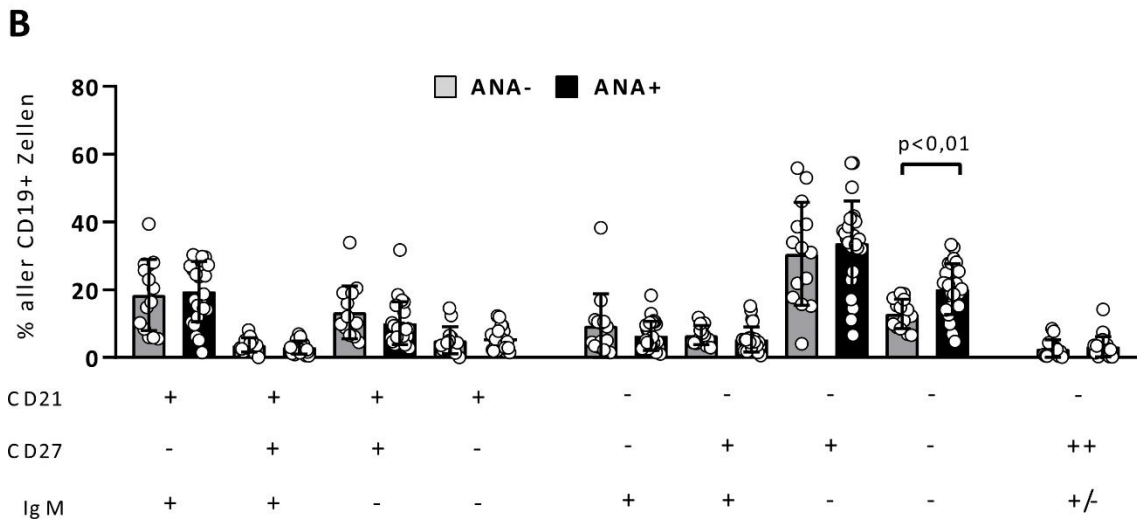
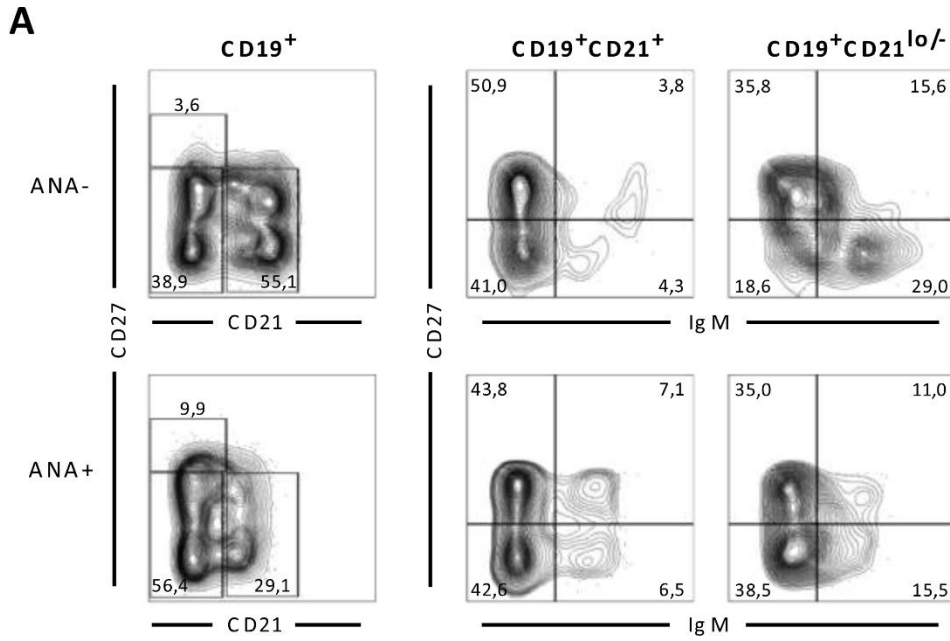
Nachdem *in vitro* also ein funktioneller Zusammenhang zwischen PD1<sup>hi</sup> T-Zellen der SF und der Entstehung einer CD21<sup>lo/-</sup>CD11c<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup> B-Zell Population hergestellt werden konnte, stellte sich die Frage, ob dieser Effekt auch *in situ* beobachtet werden kann. In einer kleinen Kohorte von 5 JIA-Patienten wurden zunächst Unterschiede im B-Zell-Phänotyp zwischen gepaarten Blut- und Synovialflüssigkeitsproben gesucht. In einer hierarchischen Clusteranalyse konnten CD19<sup>+</sup> B-Zellen der Synovialflüssigkeit klar von B-Zellen des peripheren Blutes abgegrenzt werden (Abbildung 20 A). Die B-Zellen der Synovialflüssigkeit zeigten zum großen Teil einen IgG<sup>+</sup>, klassengewechselten B-Gedächtniszell-Phänotyp mit Zeichen der Aktivierung (CD69, FAS, HLA-DR, CD86), wohingegen es sich bei B-Zellen des peripheren Blutes zum Großteil um naive, ruhende B-Zellen handelte. Weiterhin war in B-Zellen der Synovialflüssigkeit eine vermehrte Expression von CD11c und T-bet in Verbindung mit Herabregulation von CD21 – passend zu unseren Beobachtungen im *in vitro* Experiment – zu beobachten. Anschließend versuchten wir, die Verteilung definierter B-Zell-Subgruppen anhand ihrer Expression von CD21, CD27 und IgM auch quantitativ zwischen dem peripheren Blut und der Synovialflüssigkeit zu vergleichen (Abbildung 20 B, C). Unter den CD21<sup>lo/-</sup> B-Zellen der Synovialflüssigkeit bildeten CD27<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup> klassengewechselte B-Gedächtniszellen mit  $53,4 \pm 20,2$  % sowie CD27<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup> „doppelt-negative“ (DN) B-Zellen mit  $24 \pm 14,6$  % den überwiegenden Anteil. Diese beiden Populationen bildeten zudem in der Synovialflüssigkeit zu einem signifikant größeren Anteil an allen CD19<sup>+</sup> Zellen als im peripheren Blut (CD21<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>  $0,6 \pm 0,3$  % im PB vs.  $29,9 \pm 12,0$  % in SF;  $p < 0,05$ ) (CD21<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>  $1,9 \pm 1,6$  % in PB vs.  $13,4 \pm 7,6$  % in SF;  $p < 0,05$ ). Der Anteil von Plasmazellen war mit  $3,0 \pm 2,1$  % ebenfalls etwas höher in der Synovialflüssigkeit als im peripheren Blut ( $0,2 \pm 0,1$  %,  $p < 0,05$ ).



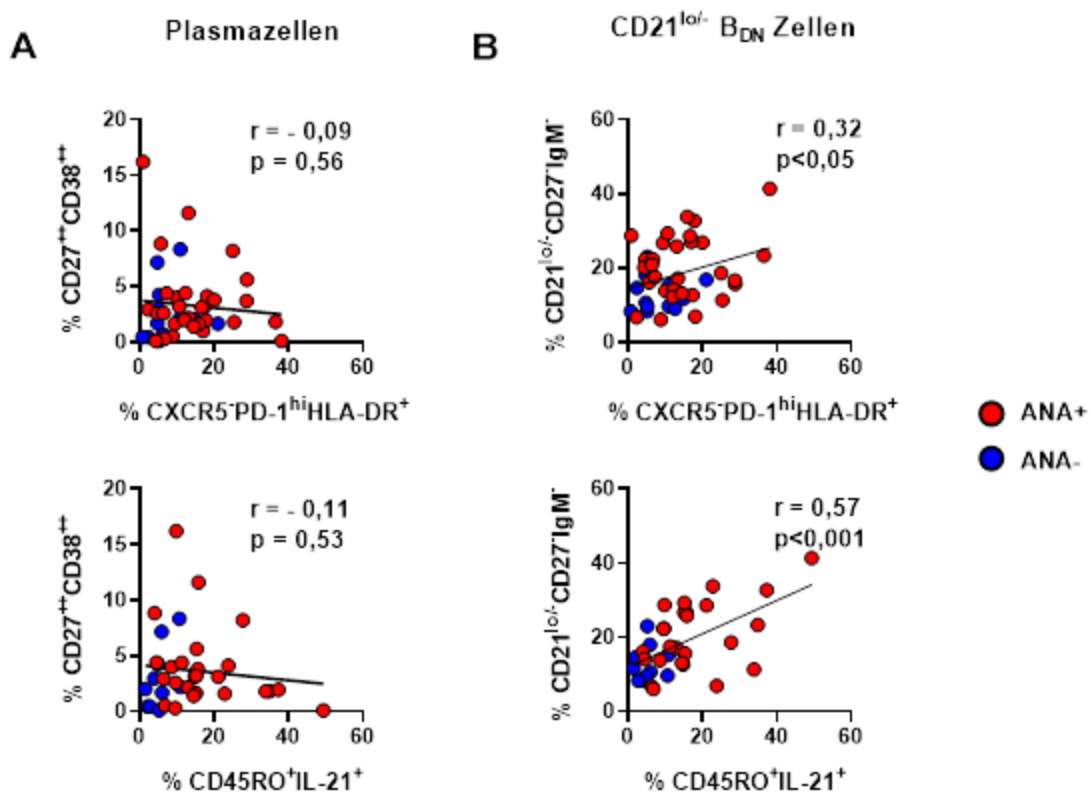
**Abbildung 20: Phänotyp von B-Zellen der Synovialflüssigkeit von JIA-Patienten.** **A** hierarchische Clusteranalyse der durchflusszytometrisch bestimmten mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) verschiedener Marker von CD19+ B-Zellen des peripheren Blutes (PB) und der Synovialflüssigkeit (SF) von 5 JIA-Patienten. Die MFI ist als Farbspektrum von blau (niedrig) nach rot (hoch) dargestellt. **B** Repräsentative Kontur-Plots zeigen die Gating-Strategie verschiedener, in C analysierter B-Zell-Populationen anhand von CD21, CD27 und IgM **C** Verteilung naiver B-Zellen, nicht klassengewechselter (NSM) und klassengewechselter B-Gedächtniszellen (SM) sowie doppelt negativer (DN) B-Zellen innerhalb der CD19+ B-Zellen der Synovialflüssigkeit von 5 JIA-Patienten im Vergleich zum peripheren Blut. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; gepaarter t-Test.

In einer größeren Kohorte von 39 JIA-Patienten verglichen wir zudem die Anteile der oben genannten B-Zell-Subgruppen zwischen ANA+ und ANA- JIA-Patienten, wobei 4 Patienten der Kohorte 2 mit einem grenzwertigen ANA-Titer von 1:80 von diesem Teil der Analyse ausgeschlossen wurden. Wir konnten jedoch überraschenderweise keine signifikanten Unterschiede des Plasmazellanteils zwischen ANA- und ANA+ Patienten erkennen und auch die meisten anderen der oben genannten B-Zell-Subpopulationen zeigten keine quantitativen Unterschiede (Abbildung 21). Lediglich der Anteil von CD21<sup>lo/-</sup>CD27-IgM<sup>-</sup> B<sub>DN</sub>-Zellen war in der ANA+ Gruppe signifikant erhöht (ANA+  $20,15 \pm 7,49$  % vs. ANA-  $12,88 \pm 4,35$  %;  $p < 0,01$ ).

Ein ähnliches Ergebnis ergab auch die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen PD-1<sup>hi</sup>HLA-DR+ T<sub>PH</sub> bzw. IL-21 exprimierenden T-Zellen und CD27<sup>++</sup>CD38<sup>++</sup> Plasmazellen bzw. CD21<sup>lo/-</sup>CD11c<sup>+</sup> B-Zellen, deren Verteilung in der Synovialflüssigkeit in einer Subkohorte von 25 JIA Patienten direkt miteinander verglichen werden konnte. Abbildung 22 A zeigt, dass in der untersuchten JIA-Kohorte keine Korrelation zwischen der Zahl PD-1<sup>hi</sup>HLA-DR+ T<sub>PH</sub>-Zellen sowie der IL-21 exprimierenden T-Gedächtniszellen und dem Anteil Plasmazellen in der SF bestand ( $r = -0,09$ ;  $p = 0,56$  sowie  $r = -0,11$ ,  $p = 0,53$ ). Anders jedoch in Bezug auf CD21<sup>lo/-</sup>CD11c<sup>+</sup> Zellen: Diese Population korrelierte in ihrer Größe signifikant mit dem T<sub>PH</sub>-Anteil ( $r = 0,32$ ;  $p < 0,05$ ) sowie hochsignifikant mit dem Anteil IL-21 exprimierender T-Gedächtniszellen ( $r = 0,57$ ;  $p < 0,001$ ) (Abbildung 22 B).



**Abbildung 21: Verteilung von B-Zell-Populationen der Synovialflüssigkeit von ANA+ und ANA- JIA-Patienten.**  
**A** Die Kontur-Plots zeigen exemplarisch die durchflusszytometrische Bestimmung der B-Zell-Subgruppen anhand ihrer Expression von CD21, CD27 und IgM in der Synovialflüssigkeit eines ANA- (obere Zeile) und eines ANA+ Patienten (untere Zeile). **B** Verteilung der B-Zell-Subpopulationen innerhalb synovialer CD19+ B-Zellen verglichen zwischen ANA- (graue Säulen, n=14) und ANA+ (schwarze Säulen, n=26) JIA-Patienten. ANA-Titer  $\geq 1:160$  wurden als positiv gewertet, Titer  $\leq 1:80$  als negativ. Grenzwertige ANA-Titer von 1:80 wurden von dieser Analyse ausgeschlossen. Die Säulen mit Fehlerbalken stehen für Mittelwert und Standardabweichung, Einzelwerte sind als Kreise dargestellt. Ungepaarter t-Test.



**Abbildung 22: Plasmazellen und CD21<sup>lo/-</sup> B<sub>DN</sub> Zellen in der Synovialflüssigkeit.** **A** zeigt den Anteil an CD38<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> Plasmazellen (Angabe in Prozent an allen B-Zellen) gegen PD-1<sup>hi</sup>CXCR5<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen (oben), sowie gegen IL-21<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen (unten) aufgetragen. **B** Korrelation zwischen CD21<sup>lo/-</sup>CD11c<sup>+</sup> B-Zellen und PD-1<sup>hi</sup>CXCR5<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>T-Zellen, sowie IL-21<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen. **A, B** Die Korrelation der jeweiligen Zellpopulationen zueinander wurde mithilfe von linearer Regression berechnet und im Diagramm als Gerade veranschaulicht. Jeder Punkt steht für eine SF-Probe (n=40). Mit angegeben sind der Korrelationskoeffizient r nach Bravais-Pearson und das Signifikanzniveau p.

## 4 Diskussion

ANA-Positivität ist in der JIA mit einem distinkten klinischen Phänotyp und Krankheitsverlauf assoziiert (17, 18). Dies führt zu der Vermutung, dass der ANA+ JIA auch eine spezifische Pathogenese zugrunde liegt, diese ist jedoch bislang noch unvollständig verstanden. Übergeordnetes Ziel dieser Arbeit war daher die Aufklärung des zellulären Musters innerhalb der ANA+ Patientengruppe der JIA. Hierzu wurden insbesondere CD4+ T-Helferzellen mit „B-Helfer“-Funktion in der Synovialflüssigkeit entzündeter Gelenke von JIA-Patienten untersucht. Die Charakterisierung von „B-Helfer“-Funktion wurde, da hierfür bislang keine einheitlichen Surrogat-Parameter existieren, anhand eines modularen Betrachtungskonzepts mit 5 Modulen vorgenommen: Expression von Transkriptionsfaktoren, Polarisierung und Zytokinprofil, Differenzierung und Aktivierung, Chemokinrezeptor-Muster sowie funktioneller Einfluss auf die Differenzierung von B-Zellen.

### 4.1 Polarisierung und Zytokinprofil

Im ersten Teil der Arbeit konnten wir zeigen, dass T-Zellen der Synovialflüssigkeit von JIA-Patienten unterschiedlicher Subgruppen ein individuelles Zytokinmuster exprimieren. Es ließen sich zwei Populationen CD4+ Zellen anhand ihrer Signaturzytokine IL-17 bzw. IL-21 unterscheiden, deren Auftreten abhängig von der JIA-Subgruppe bzw. ANA-Positivität war.

Zunehmende Bedeutung gewinnt die Erkenntnis, dass die Polarisierung von T<sub>H</sub>-Zellen während der initialen Aktivierung in Richtung eines Subgruppen-spezifischen Transkriptionsprogramms und Zytokinmusters kein endgültiger Vorgang ist, sondern dass einige dieser Zellen ein hohes Maß an Plastizität aufweisen, also abhängig vom umgebenden Zytokinmilieu ihren Effektorzell-Status wechseln können (94). Frühere Arbeiten kamen bereits zu dem Ergebnis, dass sich T<sub>H</sub>17 Zellen im inflammatorischen Milieu der JIA in Richtung eines T<sub>H</sub>1-Phänotyps mit Koexpression von IFN- $\gamma$  entwickeln (sogenannte T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>17-Zellen) und teilweise sogar ihre IL-17-Expression verlieren können (sogenannte nicht-klassische T<sub>H</sub>17-Zellen). Letztere lassen ihre Abstammung lediglich durch

eine persistierende Expression von CD161 erkennen (68, 70). Unsere Beobachtungen, dass zwar die Zahl IL-17-exprimierender Zellen nicht signifikant zwischen dem peripheren Blut und der Synovialflüssigkeit von JIA-Patienten differierte, allerdings insbesondere IL-17 und IFN- $\gamma$  koexprimierende Zellen in den entzündeten Gelenken akkumulierten, können diese These unterstützen. Hier besteht jedoch eine Einschränkung dieser Arbeit. Da die Expression von CD161 in den synovialen CD4+ Zellen nicht bestimmt wurde, kann keine Aussage über den Anteil „nicht klassischer“ TH17-Zellen innerhalb der IFN- $\gamma$  produzierenden Population getroffen werden.

TH17-Zellen scheinen besonders in der Gruppe der Spondylarthritiden eine wichtige Rolle zu spielen (95). Da die EAA zahlreiche klinische und pathophysiologische Parallelen zu dieser Erkrankungsgruppe aufweist, war es interessant zu beobachten, dass IL-17+ T-Helferzellen auch in dieser JIA-Subgruppe besonders zahlreich vertreten waren. Dass dies allerdings für alle IL-17+ T-Helferzellen, unabhängig von einer Koexpression von IFN- $\gamma$  galt, lässt vermuten, dass die TH17-Differenzierung selbst einem Spektrum innerhalb der JIA-Subgruppen folgt, mit den höchsten Anteilen in der EAA-Subgruppe und den niedrigsten in der ANA+ Oligo-/Polyarthritiden.

Im Gegensatz zu IL-17+ Zellen waren Zellen, welche das „B-Helfer“-Zytokin IL-21 produzierten besonders in Gelenken von ANA+ Oligo-/Polyarthritidenpatienten angereichert, wohingegen sie in der EAA-Gruppe selten waren. IL-21 gilt als Signatur-Zytokin von T<sub>FH</sub>-Zellen, welche an der Pathogenese zahlreicher Autoimmunerkrankungen beteiligt sind, indem sie die Differenzierung autoreaktiver B-Zellen in Plasmazellen fördern (59). Auch bei JIA-Patienten konnten bereits in histologischen Untersuchungen der Synovia organisierte lymphatische Aggregate und Plasmazellinfiltration mit dem Auftreten antinukleärer Antikörper in Verbindung gebracht werden (96). Dies lässt vermuten, dass auch hier IL-21 produzierende T-Helferzellen an der Differenzierung und Aktivierung von B-Zellen beteiligt sind. Anders als klassische T<sub>FH</sub>-Zellen exprimierten die IL-21+ T-Zellen der Synovialflüssigkeit jedoch keine weiteren B-Helfer-Zytokine wie IL-10 oder IL-4, sondern zeigten durch Koexpression von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  ein proinflammatorisches, TH1-ähnliches Zytokinmuster. Beachtung verdient die Tatsache, dass Populationen T<sub>FH</sub>-ähnlicher bzw.

peripherer T-Helferzellen – ebenfalls charakterisiert durch Koexpression von IL-21 und T<sub>H</sub>1-Zytokinen – bereits in Mausmodellen von Autoimmunerkrankungen und auch in Gelenken von erwachsenen Patienten mit seropositiver rheumatoider Arthritis beschrieben wurden (83, 85).

Die Häufigkeitsverteilung IL-17+ und IL-21+ T-Helferzellen in den Gelenken von JIA-Patienten folgte einer negativen Korrelation, was dafürsprechen könnte, dass voneinander abweichende inflammatorische Milieus innerhalb der JIA-Subgruppen Einfluss auf die Polarisierung von T-Zellen entweder in Richtung von IL-21- oder IL-17-Expression haben könnten. Allerdings folgen T<sub>H</sub>17 und T<sub>FH</sub> beim Menschen einem gemeinsamen frühen Entwicklungsweg, geprägt von IL-23, IL-1 $\beta$ , IL-6 und TGF- $\beta$  (61). T<sub>H</sub>17-Zellen scheinen zudem unter dem Einfluss von IL-12 und niedrigen TGF- $\beta$ -Leveln in der Synovialflüssigkeit von JIA-Patienten einen T<sub>H</sub>17/T<sub>H</sub>1-Phänotyp mit Ko-Produktion von IL-17 und IFN- $\gamma$  anzunehmen (68). Die Expression von CD161 in T<sub>H</sub>1-Zellen und die Analyse des TCRV $\beta$ -Repertoires lassen vermuten, dass sogar ein Teil der T<sub>H</sub>1 der Synovialflüssigkeit ursprünglich aus T<sub>H</sub>17 entstanden sind, unter anderem unter dem Einfluss von IL-12 (68, 70). Gleichermäßen scheint IL-12 an der Entstehung eines T<sub>H</sub>1/T<sub>FH</sub>-Phänotyps mit Koexpression von IL-21 und IFN- $\gamma$  beteiligt zu sein (87, 97-100). In naiven murinen T-Zellen vermittelt IL-12 über STAT4 die Produktion von IL-21 und über STAT3 die Bcl-6-Expression. IFN- $\gamma$  scheint in der Frühphase der T<sub>H</sub>1-Entwicklung in Synergie mit IL-12 die IL-21-Produktion zu fördern, später jedoch die Expression von Bcl-6, IL-21 und CXCR5 zu hemmen und über die Expression von T-bet die Differenzierung in Richtung des T<sub>H</sub>1-Phänotyps zu bewirken (87). Jedoch nicht nur naive CD4+, sondern auch T<sub>H</sub>1 können unter IL-12-Einfluss, vermittelt über STAT4 und STAT1, einen T<sub>H</sub>1/T<sub>FH</sub>-Phänotyp mit gleichzeitiger Produktion von IL-21 und IFN- $\gamma$  annehmen (99, 100). In einer früheren Arbeit konnte bereits beobachtet werden, dass aktivierte B-Zellen der Synovialflüssigkeit von JIA-Patienten als antigenpräsentierende Zellen fungieren und durch IL-12-Sekretion die Aktivierung und Polarisation von T-Zellen in Richtung eines T<sub>H</sub>1-Phänotyps fördern könnten (52). Hieraus lässt sich also die Vermutung ableiten, dass IL-21 und IFN- $\gamma$  koproduzierende T-Zellen



erst an den Inflammationsherden der JIA unter dem Einfluss von durch aktivierte B-Zellen sezerniertem IL-12 aus T<sub>H</sub>1-Zellen hervorgehen, welche wiederum gegebenenfalls ihren Ursprung in T<sub>H</sub>17-Zellen haben könnten.

#### 4.2 Differenzierung und Aktivierung

In einem weiteren Schritt konnte gezeigt werden, dass die Expression von IL-21 von einer spezifischen Effektor-T-Zell-Population in der Synovialflüssigkeit ausging, welche sich zusätzlich durch hohe Expression der Aktivierungsmarker PD-1, OX40 und HLA-DR, jedoch fehlende CXCR5-Expression auszeichnete.

Diese PD-1<sup>hi</sup> T<sub>H</sub>-Zellen der Synovialflüssigkeit wiesen phänotypische Ähnlichkeit mit anderen PD-1<sup>hi</sup> T<sub>H</sub>-Zell-Populationen auf, die bereits in Inflammationsherden diverser chronischer Infektions- und Autoimmunerkrankungen nachgewiesen werden konnten. All diesen Zellpopulationen war eine hohe Expression von PD-1, ICOS, HLA-DR, sowie IL-21 gemein, jedoch ohne Expression von CXCR5 (83, 101-104). Interessanterweise wurden diese sogenannten „peripheren T-Helferzellen“ (T<sub>PH</sub>) zuerst bei Patienten mit seropositiver rheumatoider Arthritis beschrieben und durch hohe Expression der Aktivierungsmarker PD-1, HLA-DR und OX40, ein hohes Blimp-1/Bcl-6 Verhältnis gemeinsam mit c-MAF- und ICOS-Expression und ein extrafollikuläres bzw. inflammatorisches Chemokinrezeptormuster (CXCR5- CCR2+ CCR5+) charakterisiert (85). Außerdem zeichneten sich auch die T<sub>PH</sub> der rheumatoiden Arthritis durch Koexpression von IL-21 und IFN- $\gamma$  sowie die Fähigkeit zur effizienten B-Zell-Hilfe zu Plasmazelldifferenzierung und Immunglobulinproduktion *in vitro* aus (85).

Unsere auf der Zytokin-Analyse von T-Gedächtniszellen der Synovialflüssigkeit aufbauende Vermutung, dass es sich bei der abgegrenzten IL-21+ Population um eine Form potenzieller „B-Helfer“-T-Zellen handeln könnte, erhärtete sich somit in der Analyse des Differenzierungs- und Aktivierungszustands dieser Zellen. Es konnte eine PD-1<sup>hi</sup> T<sub>H</sub>-Zell-Population identifiziert werden, welche sich einerseits durch geringere Expressionslevel von ICOS und insbesondere fehlende Expression von CXCR5 von klassischen T<sub>FH</sub> der Tonsille abgrenzte, andererseits durch hohe Expression von Aktivierungsmarkern (HLA-DR,

OX40) und besonders durch Koexpression von IL-21 und T<sub>H</sub>1-Effektorzytokinen phänotypische Kriterien peripherer T-Helferzellen erfüllte. Zum überwiegenden Teil entstammte diese Population der Gruppe der CD45RO+CCR7- Effektor-Gedächtniszellen.

### 4.3 Chemokinrezeptormuster

Zwar war es uns mangels geeigneter Synovia-Gewebeproben nicht möglich, die genaue räumliche Verteilung der T-Helferzell-Subgruppen zu bestimmen, jedoch legte die fehlende Expression von CXCR5 eine extrafollikuläre Lokalisation der synovialen PD-1<sup>hi</sup> T<sub>H</sub>-Zellen der JIA nahe. Letztere zeigten ein T<sub>H</sub>1-ähnliches, proinflammatorisches Zytokinmuster mit Expression von CCR2 und CCR5, ähnlich den in der rheumatoiden Arthritis nachgewiesenen T<sub>PH</sub>-Zellen (85).

### 4.4 Transkriptionsfaktoren

Die Koexpression von IL-21 und IFN- $\gamma$  in T-Zellen wird insbesondere durch IL-12, sowie die Transkriptionsfaktoren cMAF und T-bet induziert (98, 99, 105-107). Auch in der Differenzierung von T<sub>FH</sub> kommt es vorübergehend zu einer Koexpression von IL-21 und IFN- $\gamma$ , jedoch scheint der Großteil der IL-21 und IFN- $\gamma$  koproduzierenden Zellen unabhängig vom T<sub>FH</sub>-charakteristischen Transkriptionsfaktor Bcl-6 zu sein und somit nicht zur klassischen T<sub>FH</sub>-Linie gehören (87, 108). Die Transkriptionsfaktoren der synovialen T<sub>PH</sub> gemeinsam mit der bekannten Expression von IL-12 in B-Zellen der Synovialflüssigkeit von JIA-Patienten lässt vermuten, dass synoviale B-Zellen selbst die Differenzierung von IL-21/IFN- $\gamma$  koexprimierenden T<sub>H</sub>-Zellen bewirken.

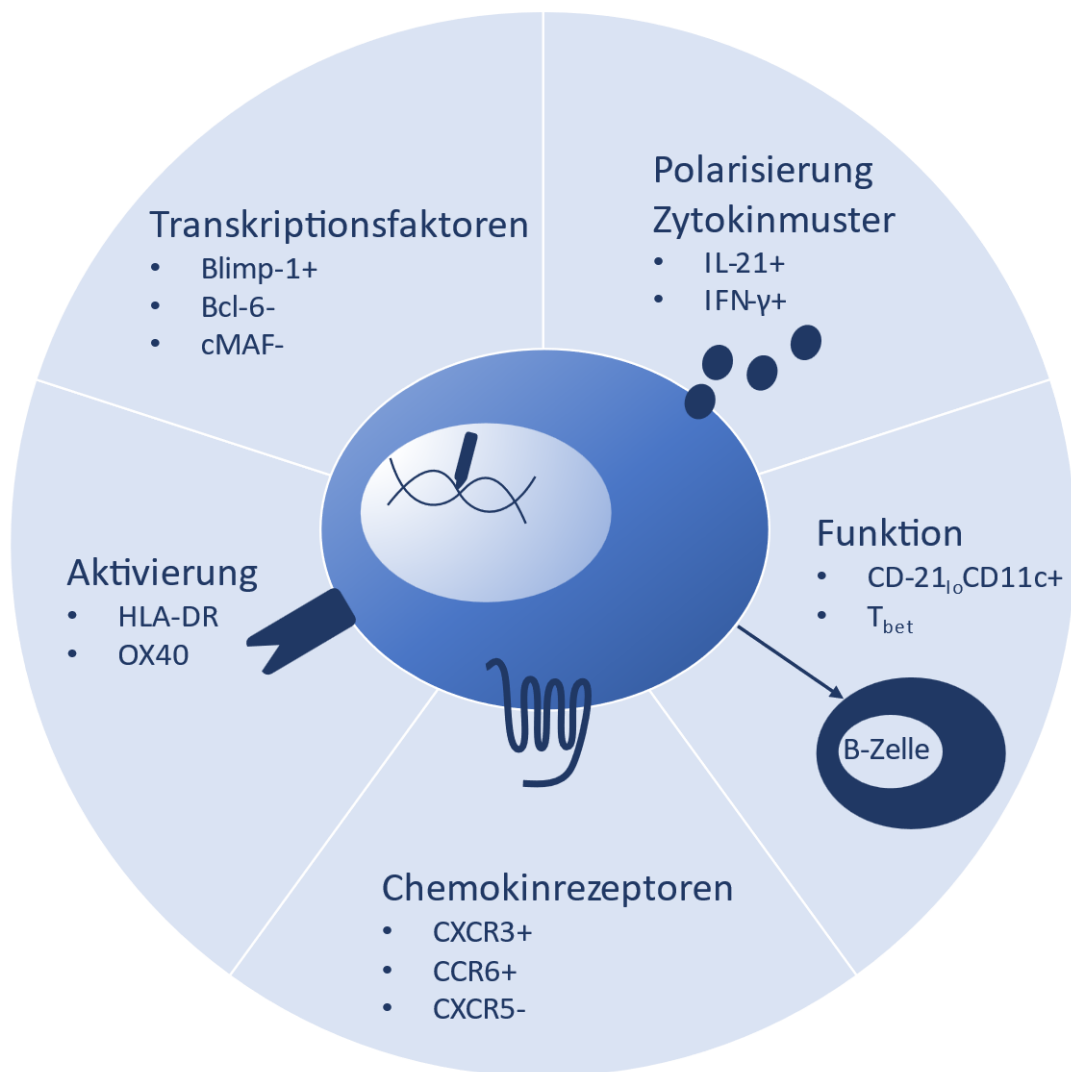
Eine kleine, im peripheren Blut von JIA-Patienten zirkulierende Population PD-1+HLA-DR+ T<sub>H</sub>-Zellen, die ebenfalls IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  koexprimierte wurde bereits früher beschrieben (109). Diese sogenannten „pathogenic-like“ T<sub>H</sub>-Zellen waren mit synovialen Klonen angereichert und korrelierten in ihrem Auftreten mit der Krankheitsaktivität. Im Gegensatz zu dieser Population zeigten die in unserer Studie untersuchten synovialen PD-1<sup>hi</sup>HLA-DR+ T<sub>H</sub>-Zellen allerdings keine zusätzliche Koexpression von IL-17, sondern stattdessen eine mit der PD-1-Expression korrelierende Expression von IL-21. Die Produktion erheblicher Zytokinmengen auf Stimulation spricht darüber hinaus gegen einen

Erschöpfungszustand dieser Zellen, der aufgrund ihrer PD-1-Expression vermutet werden könnte.

#### 4.5 Funktion

Darüber hinaus zeigten PD-1<sup>hi</sup>CXCR5-HLA-DR<sup>+</sup> T-Helferzellen der Synovialflüssigkeit entscheidende funktionelle Merkmale von T<sub>PH</sub>-Zellen, indem sie B-Zell-Hilfe zu Plasmazell-differenzierung und Immunglobulinsekretion *in vitro* in vergleichbar hohem Maße wie klassische T<sub>FH</sub>-Zellen leisteten. Bei genauerer Betrachtung erwies sich der funktionelle Einfluss auf B-Zellen allerdings als vielschichtiger. Während ein kleiner Teil der B-Zellen im *in vitro* Experiment sich in Gegenwart von PD-1<sup>hi</sup> T<sub>H</sub>-Zellen der SF zu Plasmazellen differenzierte, entwickelte ein weit größerer Teil einen CD21<sup>lo/-</sup>CD11c<sup>+</sup> Phänotyp mit Expression von T-bet. Diese Beobachtung ließ sich auch durch einen erhöhten Anteil dieses Phänotyps *ex vivo* bestätigen.

Mehrere unserer Beobachtungen sprechen dafür, dass der synergistische Effekt der von PD-1<sup>hi</sup> T<sub>H</sub>-Zellen sezernierten Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-21 essenziell für die Entwicklung von CD-21<sup>lo/-</sup>CD11c<sup>+</sup> B<sub>DN</sub> innerhalb der Synovialflüssigkeit von JIA-Patienten ist. Zum einen konnte die Induktion dieses Phänotyps *in vitro* durch T<sub>FH</sub> der Tonsille, welche zwar IL-21 und IL-4, jedoch kaum INF- $\gamma$  exprimierten, nicht beobachtet werden. Andererseits konnte dieser durch PD-1<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen der Synovialflüssigkeit vermittelte Effekt nur durch die kombinierte Blockade von IL-21 und IFN- $\gamma$  signifikant gehemmt werden. Rekombinantes IL-21 und IFN- $\gamma$  hatten zudem im *in vitro* Experiment eine synergistische Wirkung auf die T-bet-Induktion in durch CD40L stimulierten Kontroll-B-Zellen. Zuletzt deutete auch die deutliche Korrelation von CD21<sup>lo/-</sup>CD11c<sup>+</sup> B<sub>DN</sub> Zellen mit IL-21 und IFN- $\gamma$  koexprimierenden PD-1<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen der Synovialflüssigkeit *ex vivo* auf einen funktionellen Zusammenhang dieser beiden Populationen in JIA-Patienten hin.



**Abbildung 23: Modulare Betrachtung von T-Helferzellen mit B-Helferfunktion in der Synovialflüssigkeit von ANA+ JIA-Patienten.** Dargestellt sind die fünf Aspekte, unter denen T-Helferzellen in dieser Arbeit charakterisiert wurden: anhand der exprimierten Chemokinrezeptoren, Aktivierungsmarker und Transkriptionsfaktoren, des Zytokinmusters sowie der funktionellen Eigenschaften in Kokultur mit B-Zellen. Die in dieser Arbeit charakterisierte T-Helferzell-Population exprimierte nicht den TFH-typischen Chemokinrezeptor CXCR5, sondern zeigte mit CXCR3 und CCR6 ein „extrafollikuläres“ Zytokinmuster. Ebenso wurden weder Bcl-6 noch cMAF exprimiert. HLA-DR und OX40 wiesen auf einen aktivierten Zustand hin. Charakteristisch war die Koexpression von IL-21 und IFN- $\gamma$ . In Kokultur mit B-Zellen wurden Plasmazellen induziert, gleichzeitig entwickelten sich CD21<sup>lo</sup>CD11c<sup>+</sup>T<sub>bet</sub><sup>+</sup> B-Zellen.

Extrafollikuläre B-Zell-Aktivierung mit Entstehung von CD21<sup>lo</sup>CD11c<sup>+</sup> B<sub>DN</sub> Zellen wurde unter anderem bereits bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses beschrieben (25). Diese spezifische Zellart weist phänotypische Ähnlichkeit mit sogenannten „age-associated B cells“ (ABC) auf, einer zuerst in Mausmodellen entdeckten CD11c<sup>+</sup> B-Zell-Population, die sich unter anderem durch CD21-Negativität und Expression von T-

bet ausgezeichnete und auf Stimulation mit Sekretion von Autoantikörpern reagierte (43, 44). Seither wurden ABCs auch beim Menschen mit einem breiten Spektrum von Autoimmun- und Autoinflammationserkrankungen in Verbindung gebracht (42). Bei diesen humanen ABCs handelte es sich vorwiegend um Antigen-erfahrene, klassengewechselte B-Gedächtniszellen, von denen allerdings nur ein Teil T-bet und CD11c exprimierte (42). In Lupuspatienten scheinen Aktivierung der Toll-like Rezeptoren TLR7 und TLR9 unter gleichzeitigem Einfluss von IFN- $\gamma$  und IL-21 zur Induktion dieses Zelltypus zu führen, wobei insbesondere IL-21 für die Differenzierung in (ggf. autoreaktive) Plasmazellen verantwortlich zu sein scheint (25). Hingegen gibt es Hinweise, dass T-bet besonders durch Stimulation via B-Zell-Rezeptor (BCR) gemeinsam mit Kostimulation via CD40 induziert wird und BCR-Stimulation zumindest synergistisch mit TLR-Signalen auf die ABC-Proliferation wirkt (44, 50). Außerdem ist bekannt, dass T-bet-Expression – in Übereinstimmung mit unseren Beobachtungen *in vitro* – durch IFN- $\gamma$  und IL-21 gefördert wird (93). Die Bindung von Antigenen, die TLR9-Agonisten enthalten durch den BCR scheint normalerweise ein intrinsisches Zelltodprogramm in der betreffenden B-Zelle zu initiieren (110). Dies stellt vermutlich ein Element der peripheren Toleranz dar, welches verhindert, dass TLR-Liganden wie Nukleinsäuren durch gleichzeitige Stimulation von BCR und TLR als Autoadjuvanzen zur Aktivierung autoreaktiver B-Zellen führen. Durch CD40-Co-stimulation und überlebensfördernde Zytokine können die betreffenden B-Zellen jedoch vor dem programmierten Zelltod bewahrt werden und unter dem Einfluss von IFN- $\gamma$  und IL-21 einen ABC-Phänotyp annehmen (42). Ein Versagen bzw. Umgehen dieses peripheren Toleranzmechanismus könnte also ein Grund für den Zusammenhang von ABCs mit Autoimmunität sein. Ob die von uns beschriebenen CD21<sup>lo/-</sup>CD11c<sup>+</sup> B<sub>DN</sub> in JIA-Patienten ebenfalls mit autoreaktiven B-Zell-Klonen angereichert sind, wurde noch nicht untersucht. Dass diese Population im *in vitro* Experiment jedoch durch Stimulation endosomaler TLRs in Verbindung mit IFN- $\gamma$  und IL-21 induziert wurde (46) und in unseren Beobachtungen bevorzugt bei ANA<sup>+</sup> JIA-Patienten vermehrt auftrat, könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich unter diesen B-Zellen antinukleäre Klone befinden, welche auf dem oben beschriebenen Weg der Kontrolle der peripheren Toleranz entkommen sind.

Wir konnten zudem einen deutlichen quantitativen Zusammenhang zwischen CD21<sup>lo/-</sup> B<sub>DN</sub> und PD-1<sup>hi</sup>CXCR5-HLA-DR+ T<sub>H</sub>-Zellen bzw. IL-21+ T-Gedächtniszellen in den Gelenken von JIA-Patienten herstellen, was einen funktionellen Zusammenhang dieser Zellpopulationen nahelegt. Auf dieser Grundlage ließe sich spekulieren, dass das gemeinsame Auftreten IL-21 und IFN- $\gamma$  koexprimierender PD-1<sup>hi</sup>CXCR5- T-Helferzellen und CD21<sup>lo/-</sup> CD11c+ B<sub>DN</sub> das zelluläre Korrelat der Autoimmunreaktion gegen nukleäre Antigene bei ANA+ JIA-Patienten darstellt. Ob den gemeinsamen klinischen Merkmalen ANA+ JIA-Patienten jedoch tatsächlich ein spezifischer Pathomechanismus zugrunde liegt und ob das Zusammenspiel dieser beiden Populationen in den Gelenken ANA+ Patienten zum Toleranzverlust gegenüber nukleären Antigenen beiträgt, muss allerdings in weiteren Experimenten untersucht werden.

#### **4.6 Limitationen**

Bei der Interpretation der Ergebnisse sind gewisse Einschränkungen der Studie zu berücksichtigen. Zunächst konnten aufgrund des Querschnittsdesigns der Studie von jeder Patientin und jedem Patienten nur zu jeweils einem Zeitpunkt innerhalb des individuellen Krankheitsverlaufs Blut- und Synovialflüssigkeitsproben untersucht werden. Hierbei handelt es sich um eine Momentaufnahme und Einflüsse der antirheumatischen Therapie auf die untersuchten Lymphozytenpopulationen konnten nicht untersucht oder korrigiert werden. Zudem ist zu bedenken, dass die Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten im jeweiligen individuellen Krankheitsverlauf entnommen wurden.

Zudem ist anzuerkennen, dass wir den detaillierten phänotypischen Vergleich von PD-1<sup>hi</sup> und TFH der Tonsille an einer kleinen Stichprobe durchgeführt haben, um innerhalb derer konsistentere und besser vergleichbare Messungen zu erhalten. Die folgenden quantitativen Vergleiche dieser Lymphozytenpopulationen zwischen den JIA-Subgruppen und zwischen ANA- und ANA+ Gruppe wurden anhand der dort definierten phänotypischen Kriterien durchgeführt. Es könnte phänotypische Heterogenität zwischen synovialen PD-1<sup>hi</sup> in den verschiedenen Krankheitssubgruppen der JIA oder einzelnen Patienten bestehen, die mit diesem Experimentdesign somit nicht erfasst wurde.

Letztlich sollte erwähnt werden, dass der Schwellwert für ANA-Positivität von  $\geq 1:160$  aus Gründen der Vergleichbarkeit mit früheren Publikationen gewählt wurde. Ein einheitlicher Schwellwert existiert jedoch nicht, sodass unsere Ergebnisse nur bedingt mit denen anderer Publikationen zu vergleichen sind, die ANA-Positivität anders definieren.

## 5 Zusammenfassung

Der Begriff Juvenile Idiopathische Arthritis (JIA) umfasst eine klinisch heterogene Gruppe chronisch-entzündlicher Erkrankungen der Gelenke im Kindesalter. ANA-positive Patienten scheinen Subgruppen-übergreifend eine klinisch homogene Erkrankungsgruppe zu bilden. Ob diesen klinischen Gemeinsamkeiten jedoch auch eine einheitliche Pathogenese zugrunde liegt, ist bisher unbekannt. In den letzten Jahren wurde die Rolle von sogenannten peripheren T-Helferzellen ( $T_{PH}$ ) bei der aberranten Aktivierung autoreaktiver B-Zellen im Kontext zahlreicher Autoimmunerkrankungen untersucht. Ziel dieser Arbeit war daher die phänotypische und funktionelle Analyse von  $PD-1^{hi}CXCR5-CD4+$   $T_{PH}$ -Zellen, sowie deren Verteilung in der Synovialflüssigkeit von Patienten unterschiedlicher Subgruppen der JIA.

Hierzu wurden Phänotyp und Zytokinprofil von  $PD-1^{hi}CD4+$  T-Zellen durchflusszytometrisch mithilfe von Oberflächen- und intrazellulären Zytokinfärbungen analysiert. Der funktionelle Einfluss von  $PD-1^{hi}CD4+$  T-Zellen auf die B-Zell-Differenzierung wurde mittels *in vitro* Kokulturen FACS-sortierter  $PD-1^{hi}CD4+$  T-Zellen der Synovialflüssigkeit untersucht und mit klassischen  $T_{FH}$  der Tonsille verglichen.

Die Analyse des Zytokinprofils  $CD4+CD45RO+$  T-Gedächtniszellen dichotomer Expression von IL-17 oder IL-21 und jeweils Koexpression von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . Diese Populationen zeigten eine negative Korrelation zueinander, wobei IL-21+ T-Gedächtniszellen bevorzugt in Gelenken ANA-positiver Oligo-/Polyarthritispatienten akkumulierten. Die IL-21-Produktion ging besonders von  $PD-1^{hi}CXCR5-HLA-DR+CD4+$  T-Zellen aus, welche besonders in den Gelenken ANA-positiver JIA-Patienten akkumulierten. Diese Population zeigte phänotypische Ähnlichkeit mit  $T_{PH}$ -Zellen und leistete in *in vitro* Experimenten effiziente B-Zell-Hilfe zu Plasmazelldifferenzierung und Immunglobulinsekretion, induzierte jedoch – im Gegensatz zu klassischen  $T_{FH}$ -Zellen der Tonsille – zusätzlich einen  $CD21^{lo/-}CD11c+T-bet+$  Phänotyp in B-Zellen. Passend zu diesem Ergebnis konnte auch in *ex vivo* Analysen eine signifikante Korrelation zwischen  $PD-1^{hi}CXCR5-HLA-DR+$  T-Helferzellen und  $CD21^{lo/-}CD11c+T-bet+$  doppelt-negativer B-Zellen ( $B_{DN}$ ) festgestellt werden.

Es konnte also die Expansion einer spezifischen T-Zellpopulation mit phänotypischen und funktionellen Charakteristika von  $T_{PH}$ -Zellen beobachtet und deren funktioneller Zusammenhang mit  $CD21^{lo/-}CD11c+T-bet+$   $B_{DN}$  in der Synovialflüssigkeit von JIA-Patienten aufgezeigt werden. Dies könnte die Autoimmunantwort auf ubiquitäre Autoantigene innerhalb betroffener Gelenke ANA-positiver JIA-Patienten widerspiegeln.



## 6 Literaturverzeichnis

1. Prakken B, Albani S, Martini A. Juvenile idiopathic arthritis. *The Lancet*. 2011;377(9783):2138-49.
2. Danner S, Sordet C, Terzic J, Donato L, Velten M, Fischbach M, et al. Epidemiology of juvenile idiopathic arthritis in Alsace, France. *J Rheumatol*. 2006;33(7):1377-81.
3. Modesto C, Anton J, Rodriguez B, Bou R, Arnal C, Ros J, et al. Incidence and prevalence of juvenile idiopathic arthritis in Catalonia (Spain). *Scand J Rheumatol*. 2010;39(6):472-9.
4. Berntson L, Andersson Gare B, Fath A, Herlin T, Kristinsson J, Lahdenne P, et al. Incidence of juvenile idiopathic arthritis in the Nordic countries. A population based study with special reference to the validity of the ILAR and EULAR criteria. *J Rheumatol*. 2003;30(10):2275-82.
5. Petty RE, Southwood TR, Manners P, Baum J, Glass DN, Goldenberg J, et al. International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. *J Rheumatol*. 2004;31(2):390-2.
6. Nigrovic PA. Autoinflammation and autoimmunity in systemic juvenile idiopathic arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(52):15785-6.
7. Ombrello MJ. Advances in the genetically complex autoinflammatory diseases. *Semin Immunopathol*. 2015;37(4):403-6.
8. Ombrello MJ, Remmers EF, Tachmazidou I, Grom A, Foell D, Haas JP, et al. HLA-DRB1\*11 and variants of the MHC class II locus are strong risk factors for systemic juvenile idiopathic arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(52):15970-5.
9. Nigrovic PA. Review: is there a window of opportunity for treatment of systemic juvenile idiopathic arthritis? *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(6):1405-13.
10. Ravelli A, Minoia F, Davi S, Horne A, Bovis F, Pistorio A, et al. 2016 Classification Criteria for Macrophage Activation Syndrome Complicating Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis: A European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology/Paediatric Rheumatology International Trials Organisation Collaborative Initiative. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(3):481-9.
11. Giancane G, Consolaro A, Lanni S, Davi S, Schiappapietra B, Ravelli A. Juvenile Idiopathic Arthritis: Diagnosis and Treatment. *Rheumatol Ther*. 2016;3(2):187-207.
12. Heiligenhaus A, Niewerth M, Ganser G, Heinz C, Minden K, German Uveitis in Childhood Study G. Prevalence and complications of uveitis in juvenile idiopathic arthritis in a population-based nation-wide study in Germany: suggested modification of the current screening guidelines. *Rheumatology (Oxford)*. 2007;46(6):1015-9.
13. Brunner J, Sitzmann FC. The diagnostic value of anti-cyclic citrullinated peptide (CCP) antibodies in children with Juvenile Idiopathic Arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2006;24(4):449-51.
14. Ramanathan A, Srinivasalu H, Colbert RA. Update on juvenile spondyloarthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2013;39(4):767-88.
15. Ravelli A, Consolaro A, Schiappapietra B, Martini A. The conundrum of juvenile psoriatic arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2015;33(5 Suppl 93):S40-3.
16. Mahmud SA, Binstadt BA. Autoantibodies in the Pathogenesis, Diagnosis, and Prognosis of Juvenile Idiopathic Arthritis. *Front Immunol*. 2018;9:3168.

17. Ravelli A, Felici E, Magni-Manzoni S, Pistorio A, Novarini C, Bozzola E, et al. Patients with antinuclear antibody-positive juvenile idiopathic arthritis constitute a homogeneous subgroup irrespective of the course of joint disease. *Arthritis Rheum.* 2005;52(3):826-32.
18. Ravelli A, Varnier GC, Oliveira S, Castell E, Arguedas O, Magnani A, et al. Antinuclear antibody-positive patients should be grouped as a separate category in the classification of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 2011;63(1):267-75.
19. Barnes MG, Grom AA, Thompson SD, Griffin TA, Luyrink LK, Colbert RA, et al. Biologic similarities based on age at onset in oligoarticular and polyarticular subtypes of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 2010;62(11):3249-58.
20. Martini A, Ravelli A, Avcin T, Beresford MW, Burgos-Vargas R, Cuttica R, et al. Toward New Classification Criteria for Juvenile Idiopathic Arthritis: First Steps, Pediatric Rheumatology International Trials Organization International Consensus. *J Rheumatol.* 2019;46(2):190-7.
21. Murphy KM, Weaver C, Janeway C. *Janeway Immunologie.* Berlin: Springer Spektrum; 2018. 1 Online-Ressource (XL, 1207 S. 573 Abb. in Farbe) p.
22. Netea MG, Dominguez-Andres J, Barreiro LB, Chavakis T, Divangahi M, Fuchs E, et al. Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(6):375-88.
23. Meffre E, Casellas R, Nussenzweig MC. Antibody regulation of B cell development. *Nat Immunol.* 2000;1(5):379-85.
24. Sanz I, Wei C, Jenks SA, Cashman KS, Tipton C, Woodruff MC, et al. Challenges and Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations. *Front Immunol.* 2019;10:2458.
25. Jenks SA, Cashman KS, Zumaquero E, Marigorta UM, Patel AV, Wang X, et al. Distinct Effector B Cells Induced by Unregulated Toll-like Receptor 7 Contribute to Pathogenic Responses in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity.* 2018;49(4):725-39 e6.
26. Palanichamy A, Barnard J, Zheng B, Owen T, Quach T, Wei C, et al. Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy. *J Immunol.* 2009;182(10):5982-93.
27. Quach TD, Manjarrez-Orduno N, Adlowitz DG, Silver L, Yang H, Wei C, et al. Anergic responses characterize a large fraction of human autoreactive naive B cells expressing low levels of surface IgM. *J Immunol.* 2011;186(8):4640-8.
28. Burnett DL, Langley DB, Schofield P, Hermes JR, Chan TD, Jackson J, et al. Germinal center antibody mutation trajectories are determined by rapid self/foreign discrimination. *Science.* 2018;360(6385):223-6.
29. Burnett DL, Reed JH, Christ D, Goodnow CC. Clonal redemption and clonal anergy as mechanisms to balance B cell tolerance and immunity. *Immunol Rev.* 2019;292(1):61-75.
30. Klein U, Rajewsky K, Kuppers R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med.* 1998;188(9):1679-89.

31. Macallan DC, Wallace DL, Zhang Y, Ghattas H, Asquith B, de Lara C, et al. B-cell kinetics in humans: rapid turnover of peripheral blood memory cells. *Blood*. 2005;105(9):3633-40.
32. Crotty S, Felgner P, Davies H, Glidewell J, Villarreal L, Ahmed R. Cutting edge: long-term B cell memory in humans after smallpox vaccination. *J Immunol*. 2003;171(10):4969-73.
33. Seifert M, Kuppers R. Human memory B cells. *Leukemia*. 2016;30(12):2283-92.
34. Mauri C, Menon M. Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential. *J Clin Invest*. 2017;127(3):772-9.
35. Wang S, Wang J, Kumar V, Karnell JL, Naiman B, Gross PS, et al. IL-21 drives expansion and plasma cell differentiation of autoreactive CD11c(hi)T-bet(+) B cells in SLE. *Nat Commun*. 2018;9(1):1758.
36. Adlowitz DG, Barnard J, Bear JN, Cistrone C, Owen T, Wang W, et al. Expansion of Activated Peripheral Blood Memory B Cells in Rheumatoid Arthritis, Impact of B Cell Depletion Therapy, and Biomarkers of Response. *PLoS One*. 2015;10(6):e0128269.
37. Isnardi I, Ng YS, Menard L, Meyers G, Saadoun D, Srdanovic I, et al. Complement receptor 2/CD21- human naive B cells contain mostly autoreactive unresponsive clones. *Blood*. 2010;115(24):5026-36.
38. Karnell JL, Kumar V, Wang J, Wang S, Voynova E, Ettinger R. Role of CD11c(+) T-bet(+) B cells in human health and disease. *Cell Immunol*. 2017;321:40-5.
39. Knox JJ, Kaplan DE, Betts MR. T-bet-expressing B cells during HIV and HCV infections. *Cell Immunol*. 2017;321:26-34.
40. Portugal S, Obeng-Adjei N, Moir S, Crompton PD, Pierce SK. Atypical memory B cells in human chronic infectious diseases: An interim report. *Cell Immunol*. 2017;321:18-25.
41. Wang Z, Wang Z, Wang J, Diao Y, Qian X, Zhu N. T-bet-Expressing B Cells Are Positively Associated with Crohn's Disease Activity and Support Th1 Inflammation. *DNA Cell Biol*. 2016;35(10):628-35.
42. Cancro MP. Age-Associated B Cells. *Annu Rev Immunol*. 2020;38:315-40.
43. Rubtsov AV, Rubtsova K, Fischer A, Meehan RT, Gillis JZ, Kappler JW, et al. Toll-like receptor 7 (TLR7)-driven accumulation of a novel CD11c(+) B-cell population is important for the development of autoimmunity. *Blood*. 2011;118(5):1305-15.
44. Hao Y, O'Neill P, Naradikian MS, Scholz JL, Cancro MP. A B-cell subset uniquely responsive to innate stimuli accumulates in aged mice. *Blood*. 2011;118(5):1294-304.
45. Rubtsova K, Rubtsov AV, van Dyk LF, Kappler JW, Murrack P. T-box transcription factor T-bet, a key player in a unique type of B-cell activation essential for effective viral clearance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(34):E3216-24.
46. Naradikian MS, Myles A, Beiting DP, Roberts KJ, Dawson L, Herati RS, et al. Cutting Edge: IL-4, IL-21, and IFN-gamma Interact To Govern T-bet and CD11c Expression in TLR-Activated B Cells. *J Immunol*. 2016;197(4):1023-8.
47. Jenks SA, Cashman KS, Woodruff MC, Lee FE, Sanz I. Extrafollicular responses in humans and SLE. *Immunol Rev*. 2019;288(1):136-48.
48. Obeng-Adjei N, Portugal S, Holla P, Li S, Sohn H, Ambegaonkar A, et al. Malaria-induced interferon-gamma drives the expansion of Tbethi atypical memory B cells. *PLoS Pathog*. 2017;13(9):e1006576.

49. Ambegaonkar AA, Nagata S, Pierce SK, Sohn H. The Differentiation in vitro of Human Tonsil B Cells With the Phenotypic and Functional Characteristics of T-bet+ Atypical Memory B Cells in Malaria. *Front Immunol.* 2019;10:852.
50. Keller B, Strohmeier V, Harder I, Unger S, Payne KJ, Andrieux G, et al. The expansion of human T-bet(high)CD21(low) B cells is T cell dependent. *Sci Immunol.* 2021;6(64):eabh0891.
51. Zumaquero E, Stone SL, Scharer CD, Jenks SA, Nellore A, Mousseau B, et al. IFN $\gamma$  induces epigenetic programming of human T-bet(hi) B cells and promotes TLR7/8 and IL-21 induced differentiation. *Elife.* 2019;8.
52. Morbach H, Wiegering V, Richl P, Schwarz T, Suffa N, Eichhorn EM, et al. Activated memory B cells may function as antigen-presenting cells in the joints of children with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 2011;63(11):3458-66.
53. Wiegering V, Girschick HJ, Morbach H. B-cell pathology in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis.* 2010;2010:759868.
54. Marasco E, Aquilani A, Cascioli S, Moneta GM, Caiello I, Farroni C, et al. Switched Memory B Cells Are Increased in Oligoarticular and Polyarticular Juvenile Idiopathic Arthritis and Their Change Over Time Is Related to Response to Tumor Necrosis Factor Inhibitors. *Arthritis Rheumatol.* 2018;70(4):606-15.
55. Corcione A, Ferlito F, Gattorno M, Gregorio A, Pistorio A, Gastaldi R, et al. Phenotypic and functional characterization of switch memory B cells from patients with oligoarticular juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(5):R150.
56. Ueno H. T follicular helper cells in human autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 2016;43:24-31.
57. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine.* 2015;74(1):5-17.
58. de Kleer IM, Wedderburn LR, Taams LS, Patel A, Varsani H, Klein M, et al. CD4+CD25bright regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. *J Immunol.* 2004;172(10):6435-43.
59. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol.* 2011;29:621-63.
60. Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, Yusuf I, Eto D, Barnett B, et al. Bcl6 and Blimp-1 Are Reciprocal and Antagonistic Regulators of T Follicular Helper Cell Differentiation. *Science.* 2009;325(5943):1006-10.
61. Schmitt N, Liu Y, Bentebibel SE, Munagala I, Bourdery L, Venuprasad K, et al. The cytokine TGF- $\beta$  co-opts signaling via STAT3-STAT4 to promote the differentiation of human TFH cells. *Nat Immunol.* 2014;15(9):856-65.
62. Good-Jacobson KL, Szumilas CG, Chen L, Sharpe AH, Tomayko MM, Shlomchik MJ. PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nat Immunol.* 2010;11(6):535-42.
63. Yu D, Vinuesa CG. The elusive identity of T follicular helper cells. *Trends Immunol.* 2010;31(10):377-83.
64. Bryant VL, Ma CS, Avery DT, Li Y, Good KL, Corcoran LM, et al. Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5+ T follicular helper cells. *J Immunol.* 2007;179(12):8180-90.

65. Zan H, Casali P. Epigenetics of Peripheral B-Cell Differentiation and the Antibody Response. *Front Immunol.* 2015;6:631.
66. Mahendra A, Misra R, Aggarwal A. Th1 and Th17 Predominance in the Enthesitis-related Arthritis Form of Juvenile Idiopathic Arthritis. *J Rheumatol.* 2009;36(8):1730-6.
67. Maggi L, Cosmi L, Simonini G, Annunziato F, Cimaz R. T cell subpopulations in juvenile idiopathic arthritis and their modifications after biotherapies. *Autoimmun Rev.* 2016;15(12):1141-4.
68. Nistala K, Adams S, Cambrook H, Ursu S, Olivito B, de Jager W, et al. Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(33):14751-6.
69. Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Annunziato F. Th17 plasticity: pathophysiology and treatment of chronic inflammatory disorders. *Curr Opin Pharmacol.* 2014;17:12-6.
70. Cosmi L, Cimaz R, Maggi L, Santarlasci V, Capone M, Borriello F, et al. 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.* 2011;63(8):2504-15.
71. Ueno H, Banchereau J, Vinuesa CG. Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice. *Nat Immunol.* 2015;16(2):142-52.
72. Schmitt N, Bentebibel SE, Ueno H. Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood. *Trends Immunol.* 2014;35(9):436-42.
73. Li XY, Wu ZB, Ding J, Zheng ZH, Li XY, Chen LN, et al. Role of the frequency of blood CD4(+) CXCR5(+) CCR6(+) T cells in autoimmunity in patients with Sjogren's syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;422(2):238-44.
74. Luo C, Li Y, Liu W, Feng H, Wang H, Huang X, et al. Expansion of circulating counterparts of follicular helper T cells in patients with myasthenia gravis. *J Neuroimmunol.* 2013;256(1-2):55-61.
75. Simpson N, Gatenby PA, Wilson A, Malik S, Fulcher DA, Tangye SG, et al. Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2010;62(1):234-44.
76. Wang J, Shan Y, Jiang Z, Feng J, Li C, Ma L, et al. High frequencies of activated B cells and T follicular helper cells are correlated with disease activity in patients with new-onset rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol.* 2013;174(2):212-20.
77. Kenefeck R, Wang CJ, Kapadi T, Wardzinski L, Attridge K, Clough LE, et al. Follicular helper T cell signature in type 1 diabetes. *J Clin Invest.* 2015;125(1):292-303.
78. Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE, Ranganathan R, Bourdery L, Zurawski G, et al. Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity.* 2011;34(1):108-21.
79. He J, Tsai LM, Leong YA, Hu X, Ma CS, Chevalier N, et al. Circulating precursor CCR7(lo)PD-1(hi) CXCR5(+) CD4(+) T cells indicate Tfh cell activity and promote antibody responses upon antigen reexposure. *Immunity.* 2013;39(4):770-81.
80. Locci M, Havenar-Daughton C, Landais E, Wu J, Kroenke MA, Arlehamn CL, et al. Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory Tfh cells are highly functional and

correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity*. 2013;39(4):758-69.

81. Akiyama M, Yasuoka H, Yamaoka K, Suzuki K, Kaneko Y, Kondo H, et al. Enhanced IgG4 production by follicular helper 2 T cells and the involvement of follicular helper 1 T cells in the pathogenesis of IgG4-related disease. *Arthritis Res Ther*. 2016;18:167.

82. Arroyo-Villa I, Bautista-Caro MB, Balsa A, Aguado-Acin P, Bonilla-Hernan MG, Plasencia C, et al. Constitutively altered frequencies of circulating follicular helper T cell counterparts and their subsets in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(6):500.

83. Rao DA. T Cells That Help B Cells in Chronically Inflamed Tissues. *Front Immunol*. 2018;9:1924.

84. Hutloff A. T Follicular Helper-Like Cells in Inflamed Non-Lymphoid Tissues. *Front Immunol*. 2018;9:1707.

85. Rao DA, Gurish MF, Marshall JL, Slowikowski K, Fonseka CY, Liu Y, et al. Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis. *Nature*. 2017;542(7639):110-4.

86. Schmitt N, Liu Y, Bentebibel SE, Ueno H. Molecular Mechanisms Regulating T Helper 1 versus T Follicular Helper Cell Differentiation in Humans. *Cell Rep*. 2016;16(4):1082-95.

87. Nakayamada S, Kanno Y, Takahashi H, Jankovic D, Lu KT, Johnson TA, et al. Early Th1 cell differentiation is marked by a Tfh cell-like transition. *Immunity*. 2011;35(6):919-31.

88. Cannons JL, Lu KT, Schwartzberg PL. T follicular helper cell diversity and plasticity. *Trends Immunol*. 2013;34(5):200-7.

89. Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:659-702.

90. Crotty S. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity*. 2019;50(5):1132-48.

91. van der Maaten LJP, Hinton GE. Visualizing High-Dimensional Data Using t-SNE. *J Mach Learn Res*. 2008;9:2579-605.

92. van der Maaten LJP. Accelerating t-SNE using tree-based algorithms. *J Mach Learn Res*. 2014;15(1):3221-45.

93. Myles A, Gearhart PJ, Cancro MP. Signals that drive T-bet expression in B cells. *Cell Immunol*. 2017;321:3-7.

94. Saravia J, Chapman NM, Chi H. Helper T cell differentiation. *Cell Mol Immunol*. 2019;16(7):634-43.

95. McGonagle DG, McInnes IB, Kirkham BW, Sherlock J, Moots R. The role of IL-17A in axial spondyloarthritis and psoriatic arthritis: recent advances and controversies. *Ann Rheum Dis*. 2019;78(9):1167-78.

96. Gregorio A, Gambini C, Gerloni V, Parafioriti A, Sormani MP, Gregorio S, et al. Lymphoid neogenesis in juvenile idiopathic arthritis correlates with ANA positivity and plasma cells infiltration. *Rheumatology (Oxford)*. 2007;46(2):308-13.

97. de Wit J, Jorritsma T, Makuch M, Remmerswaal EB, Klaasse Bos H, Souwer Y, et al. Human B cells promote T-cell plasticity to optimize antibody response by inducing coexpression of T(H)1/T(FH) signatures. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(4):1053-60.

98. Ma CS, Suryani S, Avery DT, Chan A, Nanan R, Santner-Nanan B, et al. Early commitment of naive human CD4(+) T cells to the T follicular helper (TFH) cell lineage is induced by IL-12. *Immunol Cell Biol.* 2009;87(8):590-600.
99. Ma X, Nakayamada S, Kubo S, Sakata K, Yamagata K, Miyazaki Y, et al. Expansion of T follicular helper-T helper 1 like cells through epigenetic regulation by signal transducer and activator of transcription factors. *Ann Rheum Dis.* 2018.
100. Powell MD, Read KA, Sreekumar BK, Jones DM, Oestreich KJ. IL-12 signaling drives the differentiation and function of a TH1-derived TFH1-like cell population. *Scientific Reports.* 2019;9(1):13991.
101. Obeng-Adjei N, Portugal S, Tran TM, Yazew TB, Skinner J, Li S, et al. Circulating Th1-Cell-type Tfh Cells that Exhibit Impaired B Cell Help Are Preferentially Activated during Acute Malaria in Children. *Cell Rep.* 2015;13(2):425-39.
102. Christophersen A, Lund EG, Snir O, Sola E, Kanduri C, Dahal-Koirala S, et al. Distinct phenotype of CD4(+) T cells driving celiac disease identified in multiple autoimmune conditions. *Nat Med.* 2019;25(5):734-7.
103. Bocharnikov AV, Keegan J, Wacleche VS, Cao Y, Fonseka CY, Wang G, et al. PD-1hiCXCR5- T peripheral helper cells promote B cell responses in lupus via MAF and IL-21. *JCI Insight.* 2019;4(20).
104. Ekman I, Ihantola EL, Viisanen T, Rao DA, Nanto-Salonen K, Knip M, et al. Circulating CXCR5(-)PD-1(hi) peripheral T helper cells are associated with progression to type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2019;62(9):1681-8.
105. Schmitt N, Morita R, Bourdery L, Bentebibel SE, Zurawski SM, Banchereau J, et al. Human dendritic cells induce the differentiation of interleukin-21-producing T follicular helper-like cells through interleukin-12. *Immunity.* 2009;31(1):158-69.
106. Yu S, Jia L, Zhang Y, Zhong J, Yang B, Wu C. IL-12 induced the generation of IL-21- and IFN-gamma-co-expressing poly-functional CD4+ T cells from human naive CD4+ T cells. *Cell Cycle.* 2015;14(21):3362-72.
107. Weinstein JS, Laidlaw BJ, Lu Y, Wang JK, Schulz VP, Li N, et al. STAT4 and T-bet control follicular helper T cell development in viral infections. *J Exp Med.* 2018;215(1):337-55.
108. Carpio VH, Opatá MM, Montanez ME, Banerjee PP, Dent AL, Stephens R. IFN-gamma and IL-21 Double Producing T Cells Are Bcl6-Independent and Survive into the Memory Phase in *Plasmodium chabaudi* Infection. *PLoS One.* 2015;10(12):e0144654.
109. Spreafico R, Rossetti M, van Loosdregt J, Wallace CA, Massa M, Magni-Manzoni S, et al. A circulating reservoir of pathogenic-like CD4+ T cells shares a genetic and phenotypic signature with the inflamed synovial micro-environment. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(2):459-65.
110. Sindhava VJ, Oropallo MA, Moody K, Naradikian M, Higdon LE, Zhou L, et al. A TLR9-dependent checkpoint governs B cell responses to DNA-containing antigens. *J Clin Invest.* 2017;127(5):1651-63.

## Appendix

### I Abkürzungsverzeichnis

ABC	age associated B cell
aMBC	Atypische memory B-Zelle
ANA	antinukleäre Antikörper
ANOVA	analysis of variance
APC	antigenpräsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin (Fluoreszenzfarbstoff)
Bcl-6	B cell CLL/lymphoma 6
BCR	B-Zell-Rezeptor
B <sub>DN</sub>	CD27-IgM- doppelt-negative B-Zelle
Blimp-1	B lymphocyte-induced maturation protein-1
BSA	Bovines Serumalbumin
BV421	brilliant violet 421
CCP	zyklisches citrulliniertes Peptid
CCR	Chemokinrezeptor
CD	Cluster of Differentiation
CD45RO	auf T-Gedächtniszellen exprimierte RO-Isoform von CD45
cMaf	cellular musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogen homolog
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CpG	Dinukleotid aus Cytosin und Guanin
cT <sub>FH</sub>	zirkulierende folliculäre T-Helferzellen
CTL	zytotoxische T-Zelle
CVID	common variable immunodeficiency
CXCL	CXC-Chemokinrezeptor-Ligand
CXCR	CXC-Chemokinrezeptor
Cy7	Cyanin 7
DMSO	Dimethylsulfoxid



EAA	Enthesitis-assoziierte Arthritis
F(ab) <sub>2</sub> -anti-IgM	doppeltes antigenbindendes Fragment des Antikörpers gegen IgM
FACS	fluorescence activated cell sorter
Fas	Fas-Rezeptor (Mitglied 6 der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Familie)
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyant
FoxP3	forkhead box P3
FSC	forward scatter
hi	hoch
HLA	humanes Leukozytenantigen
ICOS	Induzierbarer Co-Stimulator
ICOSL	Ligand des induzierbaren Kostimulators
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-21-R Fc	C-terminales Fragment des Interleukin-21-Rezeptor
ILAR	International League of Associations for Rheumatology
JAK	Janus-assoziierte Kinase
JIA	Juvenile Idiopathische Arthritis
Ki-67	Proliferationsmarker (Kiel 67)
LAG3	Lymphozyten-Aktivierungsgen 3
lo/-	niedrig oder negativ
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute
$\mu$ l	Mikroliter
ml	Milliliter
MTX	Methotrexat
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid

NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
NSM	non-switched memory (Gedächtniszelle ohne Immunglobulinklassenwechsel)
OX40	Mitglied 4 der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Familie (CD134)
p	Signifikanzniveau
PB	peripheres Blut
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	phosphate-buffered Saline
PC	Plasmazelle
PCA	principal component analysis (Hauptkomponentenanalyse)
PD-1	programmed cell death protein 1
PE	Phycoerythrin
PerCP-Cy5.5	peridinin-chlorophyll-protein cyanine 5.5
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PS	Penicillin-Streptomycin
PsA	Psoriasisarthritis
PSGL1	P-selectin glycoprotein ligand
r	Korrelationskoeffizient nach Pearson
RF	Rheumafaktor
ROR $\gamma$ t	thymusspezifische Form des retinoic acid-related orphan receptor $\gamma$
RPMI	Wachstumsmedium für Zellkulturen (nach Roswell Park Memorial Institute)
Ruxo	Ruxolitinib
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
SF	Synovialflüssigkeit
SM	switched memory (Gedächtniszelle nach Immunglobulinklassenwechsel)
SSC	side scatter
STAT	signal transducer and activator of transcription
T-bet	T-box expressed in T cells
T <sub>CM</sub>	zentrale T-Gedächtniszelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
T <sub>EM</sub>	T-Effektorgedächtniszelle

T <sub>FH</sub>	follikuläre T-Helferzelle
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
T <sub>H</sub>	T-Helferzelle
TIGIT	T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains
TIM3	T cell immunoglobulin and mucin-domain containing 3
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
To	Tonsille
T <sub>PH</sub>	periphere T-Helferzellen
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zelle
t-SNE	t-distributed stochastic neighbor embedding
U/min	Umdrehungen pro Minute
XLA	X-linked agammaglobulinemia
-	negativ
+	Positiv

## II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Antigenabhängige Aktivierung von T-Helferzellen durch antigenpräsentierende Zellen. Grafik adaptiert von Ueno, 2016 (52).....	13
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Durchflusszytometers. ....	28
Abbildung 3: Beispielhafte Darstellung der Gating-Strategie zur Selektion von CD45RO+CD4+ T-Gedächtniszellen. ....	30
Abbildung 4: Zytokinexpression in CD4+CD45RO+ Populationen aus PB und SF von JIA-Patienten.. ....	45
Abbildung 5: Zwei T-Zell-Populationen in der Synovialflüssigkeit von JIA-Patienten grenzen sich durch ihre Expression von IL-21 bzw. IL-17 voneinander ab, koexprimieren jedoch beide IFN- $\gamma$ und TNF- $\alpha$ .....	47
Abbildung 6: Zwischen IL-17+ und IL-21+ T-Gedächtniszellen der Synovialflüssigkeit besteht eine negative Korrelation.....	48
Abbildung 7: Erhöhter Anteil IL-17 produzierender T-Zellen in der Synovialflüssigkeit von EAA-Patienten.....	50
Abbildung 8: Erhöhter Anteil IL-21 produzierender T-Zellen in der Synovialflüssigkeit von ANA+ Oligo-/Polyarthritispatienten. ....	51
Abbildung 9: PD1 <sup>hi</sup> CD4+ Zellen ließen sich in der Synovialflüssigkeit von JIA-Patienten, jedoch nicht im peripheren Blut nachweisen.....	52
Abbildung 10: Auftreten von PD-1 <sup>lo/-</sup> und PD-1 <sup>hi</sup> Zellen innerhalb der T-Zell-Subklassen. ....	53
Abbildung 11: Vergleich des Zytokinprofils von PD-1 <sup>lo/-</sup> CD4+ versus PD-1 <sup>hi</sup> CD4+ Zellen. ....	55
Abbildung 12: Detaillierte Analyse des Zytokinprofils synovialer PD-1 <sup>hi</sup> CD4+ Zellen... ..	56
Abbildung 13: CXCR5-Expression von PD-1 <sup>hi</sup> CD4+ Zellen der Tonsille und der Synovialflüssigkeit. ....	58

Abbildung 14: Phänotypischer Vergleich von PD-1 <sup>hi</sup> und SF PD-1 <sup>lo/-</sup> der Synovialflüssigkeit, sowie T <sub>FH</sub> der Tonsille. ....	59
Abbildung 15: Anteil PD-1 <sup>hi</sup> HLA-DR <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> Zellen innerhalb der JIA-Subgruppen und in Abhängigkeit vom ANA-Status. ....	60
Abbildung 16: Induktion von Plasmazelldifferenzierung durch tonsilläre und synoviale PD-1 <sup>hi</sup> T-Zellen. ....	62
Abbildung 17: Induktion eines CD21 <sup>lo/-</sup> CD11c <sup>+</sup> B-Zell-Phänotyps durch SF PD-1 <sup>hi</sup> . ....	65
Abbildung 20: Phänotyp von B-Zellen der Synovialflüssigkeit von JIA-Patienten. ....	67
Abbildung 21: Verteilung von B-Zell-Populationen der Synovialflüssigkeit von ANA <sup>+</sup> und ANA <sup>-</sup> JIA-Patienten. ....	69
Abbildung 22: Plasmazellen und CD21 <sup>lo/-</sup> B <sub>DN</sub> Zellen in der Synovialflüssigkeit. ....	70
Abbildung 23: Modulare Betrachtung von T-Helferzellen mit B-Helferfunktion. ....	77

### III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Daten der untersuchten JIA-Patientenkohorte für die Zytokinanalyse innerhalb der CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> T-Gedächtniszellen .....	22
Tabelle 2: Klinische Daten der Patientenkohorte für die Untersuchung von PD-1 <sup>hi</sup> CD4 <sup>+</sup> T <sub>PH</sub> .....	23
Tabelle 3: Oberflächen-Panel T-Zellen 1 .....	25
Tabelle 4: Oberflächen-Panel T-Zellen 2 .....	25
Tabelle 5: Oberflächen-Panel B-Zellen .....	25
Tabelle 6: Oberflächen-Panels T-Zytokine 1 + 2 .....	26
Tabelle 7: Intrazelluläre Färbung B-Zellen .....	26
Tabelle 8: Intrazelluläre Färbung T-Zytokine 1 .....	26
Tabelle 9: Intrazelluläre Färbung T-Zytokine 2 .....	27

Tabelle 10: Verstärkungsspannungen des FACSCanto II .....	29
Tabelle 11: Oberflächen-Panel zur Sortierung von B- und T-Zellen .....	31
Tabelle 12: 9 Kultur-Ansätze mit Kombinationen aus B- und T-Zellen mit oder ohne IL-21- und IFN- $\gamma$ -Blockade .....	32
Tabelle 13: Platte 1 für Tbet-Expression an Tag 2 .....	34
Tabelle 14: Platte 2 für Plasmazelldifferenzierung an Tag 5 .....	34
Tabelle 15: Färbepanel zur Bestimmung von T-bet an Tag 2 .....	35
Tabelle 16: Färbepanel zur Untersuchung der Plasmazelldifferenzierung an Tag 5 .....	35
Tabelle 17: verwendete Reagenzien .....	39
Tabelle 18: Antikörper für Durchflusszytometrie .....	39
Tabelle 19: neutralisierende Antikörper .....	41
Tabelle 20: Verbrauchsmaterialien .....	41
Tabelle 21: Geräte .....	41
Tabelle 22: Software .....	42

## **IV Danksagung**

Viele Menschen haben zu dieser Arbeit beigetragen. An dieser Stelle möchte ich denjenigen meinen Dank aussprechen, die in besonderer Weise zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Professor Dr. med. Christoph Härtel, Direktor der Universitäts-Kinderklinik und Poliklinik Würzburg und Professor Dr. med. Christian P. Speer, Klinikdirektor im Ruhestand für die Möglichkeit bedanken, mein Promotionsprojekt in Ihrer Klinik durchführen zu dürfen.

Mein größter Dank gilt PD Dr. med. Henner Morbach für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit, seine wertvolle Unterstützung und Beratung, seine Geduld und sein Vertrauen. Aber auch für seine ansteckende Begeisterung für die Pädiatrie und seine wissenschaftliche Neugier, die mich in meinem bisherigen Berufsweg maßgeblich beeinflusst hat, möchte ich mich bedanken.

Bei Gabriele Haase möchte ich mich für die wertvolle Hilfe bei der Durchführung der Experimente bedanken. Ich werde die gemeinsame Zeit im Labor in guter Erinnerung behalten.

Meine Familie hat mir immer zur Seite gestanden und mich ermutigt. Dafür bin ich sehr dankbar.

## **V Lebenslauf**

- In der Online-Publikation entfernt -





## VI Eigene Veröffentlichungen und Kongressteilnahme

Teile der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse wurden vorab in den 3 unten genannten Originalarbeiten veröffentlicht. Abbildungen wurden teilweise aus ebendiesen Publikationen für die Dissertationsarbeit übernommen. Die Druckerlaubnis der entsprechenden Verlage liegt dem Autor vor.

### Eigene Originalarbeiten:

**Fischer J**, Dirks J, Haase G, Holl-Wieden A, Hofmann C, Girschick H, Morbach H. IL-21(+) CD4(+) T helper cells co-expressing IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  accumulate in the joints of antinuclear antibody positive patients with juvenile idiopathic arthritis. Clin Immunol. 2020;217:108484.

Dirks J, **Fischer J**, Haase G, Holl-Wieden A, Hofmann C, Girschick H, Morbach H. CD21(lo/-)CD27(-)IgM(-) Double-Negative B Cells Accumulate in the Joints of Patients With Antinuclear Antibody-Positive Juvenile Idiopathic Arthritis. Front Pediatr. 2021;9:635815.

**Fischer J**, Dirks J, Klaussner J, Haase G, Holl-Wieden A, Hofmann C, Hackenberg S, Girschick H, Morbach H. Effect of Clonally Expanded PD-1(high) CXCR5-CD4+ Peripheral T Helper Cells on B Cell Differentiation in the Joints of Patients With Antinuclear Antibody-Positive Juvenile Idiopathic Arthritis. Arthritis Rheumatol. 2022;74(1):150-62.

### Poster:

**Fischer J**, Nothhaft M, Haase G, Saueressig M, Holl-Wieden A, Hackenberg S, Girschick H, Morbach H. IL-21 and IFN- $\gamma$  expressing T Follicular Helper-Like T cells drive B-cell dysregulation in ANA+ JIA patients

28. Jahrestagung der Gesellschaft für Kinder und Jugendrheumatologie (GKJR), 34. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Immunologie (API) 04.05.2018

**Vorträge:**

Jonas Fischer: Expansion of IFN $\gamma$ +IL-21+ Follicular Helper-like T cells in the Joints of Patients with Antinuclear Antibody positive Juvenile Idiopathic Arthritis

28. Jahrestagung der Gesellschaft für Kinder und Jugendrheumatologie (GKJR), 34. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Immunologie (API) 04.05.2018

**Auszeichnungen:**

Forschungspreis der Gesellschaft für Kinder- und Jugendrheumatologie (GKJR)  
04.05.2018