

**Einfluss von TNF- $\alpha$  Inhibitoren auf zellulärer Ebene bei  
der Juvenilen Idiopathischen Arthritis**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Gross, Helga**

**2015**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. U. Holzer

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. J. Henes



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>X</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Juvenile Idiopathische Arthritis .....	1
1.1.1 Epidemiologie .....	1
1.1.2 Klinik.....	1
1.1.3 Klassifikation .....	2
1.1.4 Pathogenese.....	5
1.1.5 Therapie.....	7
1.1.5.1 Methotrexat .....	8
1.1.5.2 Biologika.....	8
1.2 CD4 <sup>+</sup> T Zellen .....	10
1.2.1 CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> regulatorische T Zellen.....	12
1.2.2 Th1 Zellen .....	13
1.2.3 Th17 Zellen .....	15
1.2.4 Th1/Th17 Zellen.....	17
1.3 Ausgangspunkt und Zielsetzung.....	18
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>20</b>
2.1 Material.....	20
2.1.1 Patienten und gesunde Spender .....	20
2.1.2 Geräte .....	20
2.1.3 Verbrauchsmaterialien .....	21
2.1.4 Chemikalien .....	22

2.1.5	Software .....	25
2.1.6	Firmenverzeichnis.....	25
2.2	Methoden .....	26
2.2.1	Isolation mononukleärer Zellen aus peripherem Blut.....	26
2.2.2	Durchflusszytometrie .....	27
2.2.3	Charakterisierung von regulatorischen T Zellen.....	28
2.2.3.1	Oberflächenmarkierung von regulatorischen T Zellen .....	28
2.2.3.2	Detektion des intrazellulären Transkriptionsfaktors FOXP3.....	28
2.2.4	Isolation der Monozyten mittels CD14-Microbeads aus Peripherblut.....	29
2.2.5	Bestimmung IL-17 und sezernierender Zellen .....	31
2.2.6	Analyse IL-17 und IFN- $\gamma$ produzierender T Zellen .....	32
2.2.7	Einfrieren von Zellen.....	33
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>34</b>
3.1	Nachweis von CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> regulatorischen T Zellen <i>ex vivo</i> ..	34
3.1.1	Patientencharakteristika .....	34
3.1.2	Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Auswertung eines gesunden Spenders.....	36
3.1.3	Einfluss von Methotrexat <i>in vivo</i> .....	37
3.1.4	Einfluss von Methotrexat und Etanercept <i>in vivo</i> .....	39
3.1.5	Einfluss von Methotrexat und Adalimumab <i>in vivo</i> .....	42
3.1.6	Vergleich von CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> regulatorischen Zellen bei unterschiedlichen immunsuppressiven Therapieformen bei JIA .....	44
3.2	Nachweis von IL-17 und IFN- $\gamma$ produzierenden T Zellen <i>ex vivo</i> .....	46
3.2.1	Einfluss von Methotrexat <i>in vivo</i> .....	50
3.2.2	Einfluss von Methotrexat in Kombination mit Etanercept <i>in vivo</i> .....	53

3.2.3	Einfluss von Methotrexat in Kombination mit Adalimumab <i>in vivo</i> ....	55
3.2.4	Vergleich Th17 und Th1 Zellen bei unterschiedlichen Therapien .....	57
3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	59
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>60</b>
4.1	Klinische Interpretation von regulatorischen T Zellen und TNF- $\alpha$ .....	60
4.1.1	Regulatorische T Zellen bei autoimmunen Erkrankungen.....	60
4.1.2	TNF- $\alpha$ als therapeutischer Ansatzpunkt.....	62
4.2	Einfluss von immunsuppressiven Therapien auf Th1 Zellen, Th17 und Th17/Th1 Zellen .....	64
4.2.1	Wirkung von MTX .....	64
4.2.2	Effekt von TNF- $\alpha$ Inhibitoren auf regulatorische T Zellen, Th1 Zellen, Th17 und Th17/Th1 Zellen.....	65
4.3	Verhältnis von regulatorischen T Zellen zu Th1 und Th17 Zellen.....	67
4.4	Weitere Therapiemöglichkeiten der JIA.....	69
4.5	Gesamtbeurteilung und zusammenfassender Ausblick.....	70
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>Erklärung zum Eigenanteil</b> .....	<b>86</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>88</b>

## Abkürzungsverzeichnis

4-1BB	CD137, Transmembran Glykoprotein, TNF- Ligand
4S.B3	monoklonaler Antikörper, reagiert mit IFN- $\gamma$
Abb.	Abbildung
ANA	Antinukleärer Antikörper
ANOVA	analysis of variance, Varianzanalyse
anti-hu-CD3	anti-human CD3
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen präsentierende Zelle
C	Celsius
CA	California
CCL20	Chemokin Ligand 20
CCP	Citrullinierte Peptide
CCR	Chemokinrezeptor
CD	Cluster of differentiation
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CRP	C-reaktives Protein
CTLA4	cytotoxic T lymphocyte antigen 4
CXCR	CXC Chemokinrezeptor
DMARD	disease modifying antirheumatic drugs
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii

FACS	Fluorescence activated cell sorting
FAS	CD95, TNF-R
Fc (Teil)	Fragment crystallisable
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HIT3a	Klon (Antikörper), der T Zellen Aktivierung stimulieren kann
FL	Fluoreszenz
FOXP3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	Forward scatter
GATA	GATA binding protein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1Ra	IL1 Rezeptorantagonist
ILAR	International League of Associations for Rheumatology
IRF	Interferon regulatory factor
IRF4	Interferon Regulator Faktor 4
JIA	Juvenile Idiopathische Arthritis
LAG3	lymphocyte activation gene 3
LT-alpha	Lymphotoxin alpha, TNF- beta
LT- $\alpha$	Lymphotoxin-alpha
M-A251	Klon, monoklonaler Antikörper, reagiert mit CD25 Zellen
MACS	Magnetic activated cell sorting

MHC	Major of Histocompatibility Complex
MIF	Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor
Min	Minuten
ml	Milliliter
MN	Minnesota
MO	Missouri
MOPC-21	Immunglobulin zur Isotypkontrolle
mRNA	messenger RNA
mTNF- $\alpha$	Membran-assoziiertes TNF- $\alpha$
MTX	Methotrexat
n	Stichprobenumfang
NF- $\kappa$ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK Zellen	natürliche Killerzellen
nm	nanometer
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
nTregs	natürliche regulatorische T Zellen
OKT3	Muromonab-CD3, anti-human CD3
OKT4	Klon, CD4 Antikörper
OX40	CD134, TNF-R
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell, periphere mononukläre Blutzellen
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin Chlorophyll

PGE	Prostaglandine
PMA	Phorbol myristate acetat
R	Region
RA	Rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktor
ROR $\gamma$ t	retinoic acid-related orphan receptor gamma t
RPA-T4	Klon, CD4 Antikörper
RPM	rounds per minute
SAA	Serum Amyloid A
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SK3	Klon, monoklonaler Antikörper, reagiert mit CD4 Zellen
sog.	sogenannt
SSC	Side scatter
Stat	signal transducers and activation of transcription
Treg	regulatorische T Zellen
T-bet	T box expressed in T cells, Transkriptionsfaktor
TACE	TNF-alpha-converting-enzym
TCR	T Zell Rezeptor
Teff	Effektor T Zellen
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
Th	T-Helferzelle
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TNF- $\beta$	Tumornekrosefaktor beta
TNFR	TNF- Rezeptor
WA	Washington

μl

Mikroliter

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Struktur von Etanercept.....	9
Abb. 2	Subtypen der CD4 <sup>+</sup> T Zellen.....	10
Abb. 3	Th1 Differenzierung.....	13
Abb. 4	Phänotypische Analyse der CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> regulatorischen T Zellen eines gesunden Spenders.....	36
Abb. 5	Prozentualer Anteil der CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T Zellen (A) und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> regulatorischen Zellen (B) bei gesunden Spendern.....	37
Abb. 6	Phänotypische Analyse der CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> regulatorischen T Zellen eines JIA Patienten, der mit MTX behandelt wurde.....	38
Abb. 7	Prozentualer Anteil CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> T Zellen in PBMCs von gesunden Probanden und JIA Patienten mit MTX Behandlung.....	39
Abb. 8	Phänotypische Analyse der CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> regulatorischen T Zellen eines JIA Patienten, der mit MTX und Etanercept behandelt wurde.....	40
Abb. 9	Prozentualer Anteil CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> T Zellen in PBMCs von gesunden Spendern, JIA Patienten mit MTX Behandlung und JIA Patienten mit MTX + Etanercept Behandlung.....	41
Abb. 10	Phänotypische Analyse der CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> regulatorischen T Zellen eines JIA Patienten, der mit MTX und Adalimumab behandelt wurde.....	42
Abb. 11	Prozentualer Anteil CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> T Zellen in PBMCs von gesunden Probanden, JIA Patienten mit MTX Behandlung und JIA Patienten mit MTX und Adalimumab Behandlung.....	43

Abb. 12	Prozentualer Anteil $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ T Zellen bei verschiedenen Behandlungen .....	44
Abb. 13	Phänotypische Analyse der IL-17 und IFN- $\gamma$ produzierenden T Zellen eines gesunden Spenders nach Kokultivierung mit löslichem $\alpha CD3$ Antikörper und Restimulation nach fünf Tagen .....	47
Abb. 14	Phänotypische Analyse der IL-17 und IFN- $\gamma$ produzierenden T Zellen eines JIA Patienten mit MTX Behandlung nach Kokultivierung mit löslichem $\alpha CD3$ Antikörper und Restimulation nach fünf Tagen .....	51
Abb. 15	Prozentualer Anteil $IL-17^+$ , $IFN-\gamma^+$ , $IL-17^+/IFN-\gamma^+$ $IL-17^+/Stat3^+$ T Zellen in PBMCs gesunder Probanden und PBMCs von JIA Patienten mit MTX Behandlung .....	52
Abb. 16	Prozentualer Anteil $IL-17^+$ , $IFN-\gamma^+$ , $IL-17^+/IFN-\gamma^+$ $IL-17^+/Stat3^+$ T Zellen in PBMCs von gesunden Spendern, JIA Patienten mit MTX Behandlung und JIA Patienten mit MTX + Etanercept Behandlung .....	54
Abb. 17	Prozentualer Anteil $IL-17^+$ , $IFN-\gamma^+$ , $IL-17^+/IFN-\gamma^+$ $IL-17^+/Stat3^+$ T Zellen in PBMCs von gesunden Spendern, JIA Patienten mit MTX Behandlung und JIA Patienten mit MTX + Adalimumab Behandlung .....	56
Abb. 18	Prozentualer Anteil $IL-17^+$ , $IFN-\gamma^+$ , $IL-17^+/IFN-\gamma^+$ $IL-17^+/Stat3^+$ T Zellen bei verschiedenen Behandlungen .....	58

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Einteilung der JIA nach ILAR Kriterien .....	4
Tab. 2	Charakteristika der Patienten in der Studie .....	35
Tab. 3	Charakteristika der Patienten in der Studie .....	49

# 1 Einleitung

## 1.1 Juvenile Idiopathische Arthritis

Die Juvenile Idiopathische Arthritis (JIA) beschreibt eine klinisch heterogene Gruppe von Arthritiden, die sich vor dem 16. Lebensjahr mit einer Dauer von mindestens sechs Wochen und unbekannter Ätiologie manifestiert [1].

### 1.1.1 Epidemiologie

Die Epidemiologie der JIA ist weltweit unterschiedlich, jedoch die häufigste chronisch rheumatische Erkrankung bei Kindern. Des Weiteren hat die JIA weltweit eine Inzidenz von ~1:1000 Kindern/Jahr [2]. Untersuchungen in entwickelten Ländern zeigen eine Prävalenz zwischen 16 und 150 pro 100 000 [1]. In Süddeutschland liegt die Inzidenz der JIA bei 7.5 und die Prävalenz bei 16.5 pro 100 000 [3].

Darüber hinaus werden in Deutschland 1400 Neuerkrankungen pro Jahr und insgesamt 140.000 an JIA erkrankte Kinder und Jugendliche unter 16 Jahren gezählt [4]. Bis auf einen Subtyp, der Enthesitis assoziierten Arthritis, erkranken Mädchen häufiger an JIA als Jungen [4].

Anzumerken ist, dass der Umfang der Prävalenz- und Inzidenzangaben deswegen so groß ist, weil unterschiedliche Diagnosekriterien, verschiedene Definitionen von klinischen Fällen, Fallerhebungen, Qualifikationen und Erfahrungen von Klinikern und anderen Faktoren (Lebensstandard, Gesundheitsressourcen) dabei eine Rolle spielen [5].

### 1.1.2 Klinik

Im Vordergrund steht bei der JIA die Synovialentzündung der Gelenke. Typische Entzündungszeichen wie Schwellung, Schmerzen, Rötung, Überwärmung und Bewegungseinschränkung treten ebenfalls auf. Des Weiteren kann es zu

Knorpel- und Knochenzerstörungen, Gelenkfehlstellungen und Gelenkversteifungen (Ankylosen) kommen [6].

Hauptmanifestationsort der JIA ist das Kniegelenk [7]. Je nach Verlaufsform können zu den artikulären Symptomen extraartikuläre Manifestationen wie Fieber, Exantheme, Uveitiden, Enthesitiden, Psoriasis, Tenosynovitiden, Vaskulitiden, Serositiden und Rheumaknoten hinzutreten [6]. Besondere Verlaufsformen stellen die Psoriasis Arthritis und Ankylosierende Arthritis dar. Bei der Psoriasis Arthritis treten häufig zuerst die Gelenkerscheinungen auf, bevor es zu dermatologischen Manifestationen kommt. Es ist die einzige Form, bei der Jungen und Mädchen gleich häufig betroffen sind und gehäuft eine positive Familienanamnese und HLA-CW6 Assoziation vorliegt [8].

Die Ankylosierende Arthritis (Spondylarthritis) zeichnet sich durch die Besonderheit aus, dass eine Arthritis und/oder Enthesitis mit Beteiligung der Wirbelsäule, Sakroiliakgelenken und peripheren Gelenken auftritt. Weiterhin sind im Serum weder IgM Rheumafaktor noch antinukleäre Antikörper messbar, jedoch liegt eine HLA-B27 Assoziation vor [9–11].

### **1.1.3 Klassifikation**

Um die heterogene Gruppe der chronischen Arthritis weltweit hinsichtlich Genetik, Serologie, Epidemiologie und Therapieschemata vergleichbar zu machen, wurden 1994 die Klassifikationskriterien durch die „International League of Associations for Rheumatology“ (ILAR) in Santiago de Chile erstmals eingeführt. 1997 wurden die Kriterien in Durban überarbeitet und der Begriff Juvenile Idiopathische Arthritis als Oberbegriff für die chronische Arthritis, die vor dem 16. Lebensjahr auftritt, länger als mindestens sechs Wochen anhält und aus unbekannter Ursache entsteht, geschaffen [12]. Dadurch wurden die Begriffe „Juvenile Chronische Arthritis“ und „Juvenile Rheumatoide Arthritis“, die in Europa oder Nordamerika Verwendung fanden, von der Bezeichnung „Juvenile Idiopathische Arthritis“ abgelöst [13].

Da es sich bei der JIA um eine Ausschlussdiagnose handelt, müssen folgende Krankheitsbilder bei der entsprechenden Subklassifikation ausgeschlossen wer-

den, bevor die Diagnose JIA mit dem entsprechenden Subtyp klassifiziert/gestellt werden kann:

- a. Psoriasis oder frühere Psoriasis bei dem betroffenen Patienten oder Verwandten 1. Grades.
- b. Arthritis bei einem HLA-B27 positiven Jungen nach dem 6. Lebensjahr.
- c. Ankylosierende Spondylitis, Enthesitis assoziierte Arthritis, Sakroiliitis bei chronisch entzündlicher Darmerkrankung, Reiter-Syndrom, akute anteriore Uveitis oder das Auftreten einer dieser Erkrankungen bei einem Verwandten 1. Grades.
- d. Der Nachweis vom IgM Rheumafaktor bei mindestens zwei Untersuchungen im Abstand von mindestens drei Monaten.
- e. Der Nachweis einer systemischen JIA bei dem Patienten.

Welche der jeweiligen Exklusion angewandt wird, ist unter der jeweiligen Kategorie erkennbar.

Tabelle 1 zeigt die Einteilung der JIA nach ILAR, welche die JIA aufgrund unterschiedlicher Kriterien in acht Subtypen gliedert [14]. Die Besonderheiten sind entnommen [4].

**Tab. 1 Einteilung der JIA nach ILAR Kriterien**

ANA = Antinukleärer Antikörper; RF = Rheumafaktor; CCP = citrullinierte Peptide; HLA-B27 Antigen = humanes Leukozytenantigen Typ B27

Subtyp	Definition	Kriterien / Exklusionen	Besonderheit
<b>1. Systemische Arthritis</b>	Arthritis $\geq$ 1 Gelenk + aktuell oder vorher aufgetretenes Fieber über $\geq$ 2 Wochen und über $\geq$ 3 Tage täglich + $\geq$ 1 Kriterium	<ul style="list-style-type: none"> <li>- flüchtiges Exanthem</li> <li>- generalisierte Lymphknotenschwellungen</li> <li>- Hepato- und/oder Splenomegalie</li> <li>- Serositis</li> </ul> <p>Exklusionen: a, b, c, d</p>	
<b>Oligoarthritis</b>	Arthritis $\leq$ 4 Gelenken während der ersten 6 Krankheitsmonate. <b>2. persistierend:</b> $\leq$ 4 Gelenke <b>3. extended:</b> $>$ 4 Gelenke nach den ersten 6 Monaten	Exklusionen: a, b, c, d, e	<ul style="list-style-type: none"> <li>- häufigste Form</li> <li>- jüngstes Alter zum Erkrankungsbeginn</li> <li>- 60% ANA+</li> <li>- beste Prognose [15]</li> </ul>
<b>4. RF negative Polyarthritis</b>	Arthritis $\geq$ 5 Gelenke während der ersten 6 Krankheitsmonate; kein RF Nachweis.	Exklusionen: a, b, c, d, e	
<b>5. RF positive Polyarthritis</b>	Arthritis $\geq$ 5 Gelenke während der ersten 6 Krankheitsmonate; $\geq$ 2 positive RF Nachweise im Abstand von $\geq$ 3 Monaten während der ersten 6 Krankheitsmonate	Exklusionen: a, b, c, e	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 83% ♀</li> <li>- mittleres Erkrankungsalter 12. Lebensjahr</li> <li>- häufig Autoantikörpern gegen CCP [16]</li> </ul>
<b>6. Enthesitis-assoziierte Arthritis</b>	Arthritis und Enthesitis, oder Arthritis oder Enthesitis + $\geq$ 2 Kriterien	<ul style="list-style-type: none"> <li>- aktuelle oder zuvor aufgetretene Schmerzen im Sakroiliakgelenk und/oder entzündliche lumbosakrale Schmerzen</li> <li>- Nachweis von HLA-B27 Antigen</li> <li>- Arthritisbeginn bei ♂ <math>&gt;</math> 6 Jahre</li> <li>- akute symptomatische anteriore Uveitis</li> <li>- Ankylosierende Spondylitis, Enthesitis assoziierte Arthritis, Sakroiliitis bei entzündlicher Darmerkrankung, Reiter Syndrom oder akute anteriore Uveitis bei einem Verwandten 1. Grades.</li> </ul> <p>Exklusionen: a, d, e</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- häufiger bei ♂</li> <li>- 66% HLA-B27+</li> </ul>
<b>7. Psoriasis-Arthritis</b>	Arthritis und Psoriasis, oder Arthritis und $\geq$ 2 der Kriterien	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Daktylitis</li> <li>- Tüpfelnägel oder Onycholyse</li> <li>- Psoriasis bei einem Verwandten 1. Grades</li> </ul> <p>Exklusionen: b, c, d, e</p>	
<b>8. "andere Arthritis"</b>	Arthritis, welche entweder Kriterien von keinem oder von $\geq$ 2 der oben genannten Subtypen erfüllt		

#### 1.1.4 Pathogenese

Die Ätiologie der JIA ist noch nicht geklärt, es wird jedoch vermutet, dass genetische Einflüsse, Umweltfaktoren und (bakterielle/virale) Infektionen bei der Pathogenese eine Rolle spielen [1, 17].

Die JIA ist eine Autoimmunerkrankung, bei der es ohne erkennbare Ursache zu Gelenkentzündungen kommt, jedoch keine hohen Titer von Autoantikörpern oder antigenspezifischen T Zellen gefunden werden können [18].

Je nach Subtyp greifen unterschiedliche Pathomechanismen, was an den Besonderheiten der jeweiligen Kategorien erkennbar ist.

Zum einen liegen histopathologische Hinweise vor, dass es zu einer antigenabhängigen und T-zellvermittelten Immunreaktion in der Synovia kommt, weil CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zelle und B-Zellen sowie Makrophagen, dendritische Zellen und Plasmazellen in der Synovia nachgewiesen werden können. Der Einstrom von diesen Zellen aus dem Peripherblut in die Synovia und fibroblast- und makrophagenähnliche Synovialozyten verursachen eine Gelenkentzündung und Knorpelzerstörung [19, 20].

Zum anderen kennzeichnet das Vorhandensein von ANAs, Antikörper gegen unterschiedliche nukleäre Strukturen, die Beteiligung von B-Zellen an der JIA [17]. ANAs werden hauptsächlich mit der early-onset Oligoarthritis assoziiert, können aber keinem JIA-spezifischen nukleären Angriffsort zugeordnet werden [1].

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass regulatorische T Zellen an der Pathogenese der JIA beteiligt sind und ausschlaggebend dafür sind, ob es zu der persistierenden oder extended Form der Oligoarthritis bzw. Polyarthritis kommt.

Untersuchungen zeigten, dass der Anteil von aktivierten regulatorischen T Zellen in der Synovialflüssigkeit bei Patienten mit persistierender Oligoarthritis größer ist als bei Patienten mit der extended Form der Oligoarthritis [21, 22]. Die Ergebnisse dieser Studien lassen vermuten, dass regulatorische T Zellen eine krankheitslimitierende Eigenschaft besitzen.

Außerdem spielt die Genetik bei der Entstehung der JIA eine essentielle Rolle. Darunter fallen unterschiedliche Gene, welche für die HLA (Humanes Leukozytenantigen) Proteine kodieren [23]. HLA Proteine werden dem adaptiven Immunsystem zugeordnet und können in HLA Klasse I Antigene (A, B, C) und HLA Klasse II Antigene (DR, DQ, DP) eingeteilt werden. HLA-DR und HLA-DQ Moleküle werden von dendritischen Zellen exprimiert [24]. Makrophagen werden über eine Entzündung aktiviert und leiten diese MHC II (=HLA II) vermittelt an die T Zellen weiter [15].

Es ist bekannt, dass die T Zellinfiltrate in der Synovia überwiegend aus CD4<sup>+</sup> Th1 Zellen bestehen. Diese erkennen HLA Klasse II Antigene, aktivieren Gedächtniszellen und exprimieren hohe Konzentrationen von den Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR3 [25, 26]. Chemokine tragen zur Migration von Immunzellen aus der Blutbahn in die Synovia bei.

Besonders der Subtyp der Oligoartikulären Arthritis ist mit einer geringeren Konzentration der HLA Antigene HLA-A2 und HLA-DR5 verbunden. Bei dem Subtyp der RF-positiven Arthritis spielt HLA-DR4 [27] und bei der Enthesitis assoziierten Arthritis HLA-B27 eine Rolle [28].

Außerdem wird vermutet, dass die proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , der Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-1 (IL-1) zur Pathogenese beitragen.

Die Konzentration des MIF ist bei der systemischen Arthritis, einem aggressiven Subtyp, unter allen JIA Subtypen am höchsten [29]. Es wird vermutet, dass der Grund für die hohen Konzentrationen von MIF im Serum und in der Synovialflüssigkeit bei Patienten mit der systemischen Form ein Single-Nukleotide-Polymorphism (=Variationen einzelner Basenpaare in einem DNA-Strang) in der Regulatorregion für die Zytokine des IL-6 Gens und des MIF ist. Erwähnenswert ist, dass die hohen MIF Konzentrationen mit der Krankheitsaktivität und dem Langzeitergebnis korrelieren [29, 30, 31, 32].

Darüber hinaus ist die proinflammatorische Zytokinkonzentration des IL-6 bei der systemischen Form sehr hoch und korreliert mit dem Ausmaß der Gelenkbeteiligung [33, 34].

Die überschießende IL-6 Produktion kann auch eine Erklärung für die extraartikulären Manifestationen wie der mikrozytären Anämie [35, 36] und für die Wachstumsverzögerung sein [37]. Daher wird vermutet, dass IL-6 eine Schlüsselrolle im Verlauf einer JIA besitzt [38].

Eine andere wichtige Rolle spielt das proinflammatorische Zytokin IL-1. Patienten mit systemischer JIA, die mit einem rekombinanten IL-1-Rezeptorantagonisten behandelt wurden, zeigten eine klinische Besserung [39]. Außerdem wurde in einer Studie dargestellt, dass die Inkubation von gesunden PBMCs mit dem Serum von Patienten mit systemischer JIA die Transkription von Genen, welche dem angeborenen Immunsystem angehören, wie auch das Gen für IL-1, aktiviert werden [39].

Da Stress eine vermehrte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine verursacht, kommt Stress bei der JIA auch eine entscheidende Bedeutung zu [17].

### **1.1.5 Therapie**

Die Therapie der JIA richtet sich nach dem Schweregrad und kann in nicht-medikamentöse und medikamentöse Therapien eingeteilt werden. Oberstes Therapieziel ist die Lebensqualitätssteigerung durch den Rückgang der Beschwerden und die Unabhängigkeit von Schmerzen [6].

Zur nicht-medikamentösen Therapie gehören die Physio- und Ergotherapie mit der Intention, die Funktionalität der Gelenke zu erhalten [6].

Die medikamentöse Therapie beabsichtigt die Schmerzfreiheit und erfolgt größtenteils nach einem Stufenschema. Es wird mit den nichtselektiven nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) begonnen. Häufig verwendet werden Indometacin, Naproxen, Ibuprofen und Diclofenac. Diese hemmen die Cyclooxygenasen 1 und 2, wodurch die Synthese von Prostaglandinen, Gewebshormone, welche für Schmerz und Entzündung verantwortlich sind, vermindert wird [6].

Die nächste Stufe bilden Corticosteroide, welche die höchste Potenz gegen Entzündungen aufweisen. Diese vermindern u. a. die Sekretion

proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1. Sie können lokal, also intraartikulär, oder systemisch (zeitlich begrenzt) verabreicht werden [40].

Patienten, welche auf die konventionellen antirheumatischen Medikamente nicht ansprechen, profitieren von der Einführung immunsuppressiver Therapien mit Methotrexat (MTX) und Biologika [1, 41, 42].

#### **1.1.5.1 Methotrexat**

MTX ist ein Dihydrofolatreduktase-Inhibitor und zählt zu den disease modifying antirheumatic drugs (DMARD) und Antimetaboliten.

Therapeutischen Effekt zeigt MTX, weil es immunsuppressiv wirkt, die Zellproliferation reduziert, die Rate an Apoptose von T Zellen und die Adenosinfreisetzung erhöht und die Expression von zellulären Adhäsionsmolekülen, die humorale Immunität verändert. Des Weiteren vermindert MTX die Knochendichte, was eine nicht zu vernachlässigende Nebenwirkung von MTX bei Kindern und Jugendlichen darstellt.

Darüber hinaus beeinflusst MTX die Zytokinproduktion, insbesondere hemmt es die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- [43]. Neben der Wirkung von MTX auf zellulärer Ebene, führt es zur Steigerung der Lebensqualität [41].

#### **1.1.5.2 Biologika**

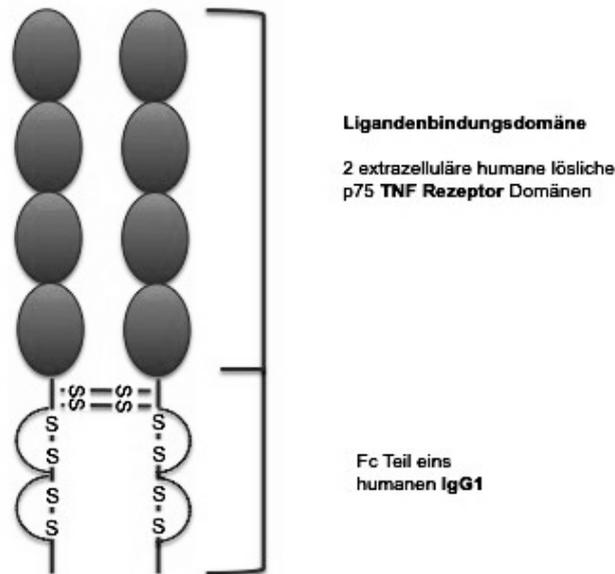
Die Therapie mit Biologika wird erst begonnen, wenn mit NSAR und DMARD kein Therapieerfolg erzielt werden kann. Biologika sind Antikörper, welche die Aktivität der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 blockieren und somit die Aufrechterhaltung der Entzündung unterbinden.

Zur Gruppe der TNF- $\alpha$  Inhibitoren gehören Etanercept, Adalimumab und Infliximab.

Etanercept (Enbrel®) ist ein gentechnologisch hergestelltes Fusionsprotein, bei dem zwei identische Ketten vom rekombinanten extrazellulären löslichen humanen TNF-Rezeptor (TNF-R) p75 Monomer mit dem Fc-Teil des humanen IgG1

fusioniert sind. Die Ligandenbindungsstelle TNF-R1 bindet TNF- $\alpha$  und TNF- $\beta$  (=Lymphotoxin- $\alpha$ ) und blockiert somit dessen Aktivität [44], [45].

Abbildung 1 zeigt die molekulare Struktur von Etanercept [46].



**Abb. 1 Struktur von Etanercept**

Etanercept ist ein Fusionsprotein, bestehend aus der TNF-Ligandenbindungsdomäne, welche zwei extrazelluläre Ketten des humanen, löslichen TNF-R p 75 besitzt und dem humanen IgG Fc Fragment.

Adalimumab (Humira®) ist ein humaner monoklonaler Antikörper und Infliximab (Remicade®) ist ein chimärer monoklonaler Antikörper gegen TNF- $\alpha$ , welche an TNF- $\alpha$  binden und deren Wirkung inhibieren.

Des Weiteren gehören die IL-1 Zytokinantagonisten Anakinra, Canakinumab, Rilonacept sowie Tocilizumab, ein Antikörper gegen den IL-6 Rezeptor, zu den Biologika.

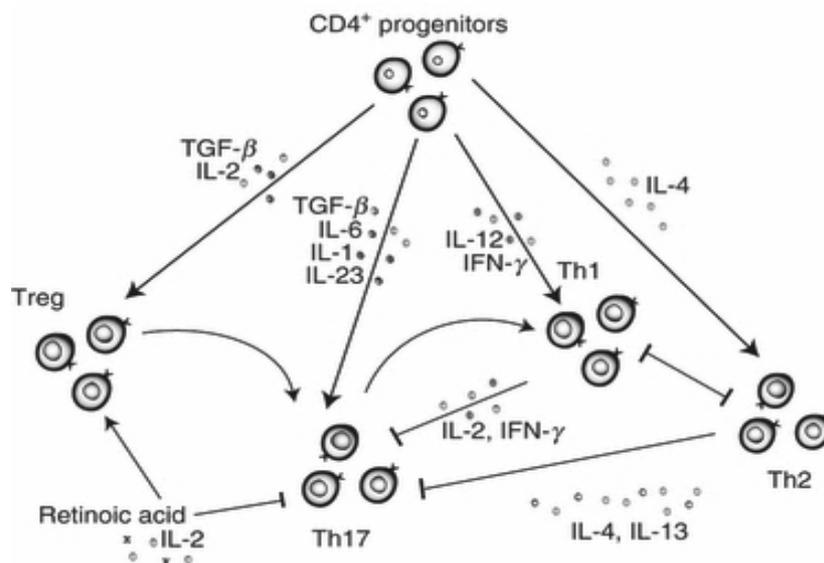
Insgesamt wird die Wirkung von Biologika erzielt, indem die proinflammatorischen Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1), deren Rezeptoren und Signalkaskaden blockiert werden. Dazu zählen B und T Zellantworten, Unterbindung von Zell-Zell-Kontakten, Zelladhäsionsmolekülen, Endothelaktivierung und Einwandern von

Entzündungszellen ins Gewebe [47]. Dadurch greifen Biologika aktiv in den Entzündungsprozess ein und verhindern das Fortschreiten.

## 1.2 CD4<sup>+</sup> T Zellen

Aus naiven CD4<sup>+</sup> T Zellen können sich je nach Antigen- und Umwelteinflüssen sowie Zytokinmilieu, nachdem sie von dendritischen Zellen (APCs) aktiviert worden sind, vier Unterformen der T Zellen entwickeln: Die proinflammatorischen T-Helfer Zellen vom Th1-, Th2- und Th17-Typ, auch Effektorzellen genannt, und die antiinflammatorischen regulatorischen T Zellen. Diese grenzen sich voneinander ab, indem sie zur Differenzierung verschiedene Zytokine benötigen, über unterschiedliche Transkriptionsfaktoren aktiviert werden und selbst verschiedenartige Zytokine sezernieren. Sie sind jedoch sehr plastisch und können ihr Zytokinprofil ändern [48].

Abbildung 2 stellt die Subtypen der CD4<sup>+</sup> T Zellen dar [49].



**Abb. 2 Subtypen der CD4<sup>+</sup> T Zellen**

Dargestellt ist die Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T Zellen. Nachdem naive CD4<sup>+</sup> T Zellen von APCs aktiviert werden, differenzieren sie je nach Zytokinmilieu und Transkriptionsfaktoren zu unterschiedlichen Subtypen mit entsprechender Zytokinsekretion. So ist IL-12 verantwortlich für die Differenzierung zu Th1 Zellen, welche IFN-γ sezernieren. IL-4 führt zur Entwicklung von Th2 Zellen, die IL-13, IL-5 und IL-4 ausschütten. Des Weiteren werden unter dem Einfluss von IL-1,

IL-6, IL-23 Th17 Zellen gebildet, die dann IL-17, IL-22 und IL-26 sezernieren. Die Anwesenheit von IL-2 und TGF- $\beta$  führt zur Bildung von Tregs.

T-bet= T box expressed in T cells; GATA= GATA binding protein; ROR $\gamma$ t: retinoic acid-related orphan receptor gamma t; FoxP3= forkhead box P3.

Während Effektorzellen durch proinflammatorische Zytokinsekretion die Entzündung aufrechterhalten bzw. fördern, tragen regulatorische T Zellen zur Entzündungsminderung bei [48, 50].

Zytokine sind eine große Gruppe von Polypeptiden und kleinen Proteinen, welche Effektormoleküle für Zellen sind, die bei der Immun- und Entzündungsantwort eine Rolle spielen. Es wird vermutet, dass bei Autoimmunerkrankungen die Immunhomöostase gestört ist und ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen und T Helferzellen besteht [51].

Das Zytokin TGF- $\beta$ , welches eine wichtige Rolle bei der Differenzierung naiver CD4<sup>+</sup> T Zellen spielt, nimmt eine Sonderstellung bei der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen ein, indem es über die Immunantwort und die Immuntoleranz entscheidet [52, 53]. In Studien mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Ausschaltung von Signalwegen in T Zellen, die TGF- $\beta$  abhängig sind, eine unkontrollierte T Zellproliferation, Entzündungen und Autoimmunerkrankungen auslöst. Deshalb wird angenommen, dass für eine intakte T Zellhomöostase TGF- $\beta$  Signale notwendig sind [54].

Des Weiteren führt TGF- $\beta$  ohne Anwesenheit von IL-6 zur Differenzierung von antiinflammatorischen Tregs [55]. In Mäusen hat TGF- $\beta$  in Anwesenheit von IL-6 eine Differenzierung von proinflammatorischen Th17 Zellen zur Folge (siehe Abb.1) [56].

Demnach hat IL-6 eine entscheidende Bedeutung für die Differenzierung naiver CD4<sup>+</sup> T Zellen.

### 1.2.1 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatorische T Zellen

Die phänotypische Charakterisierung natürlicher regulatorischer T Zellen (nTregs) wird anhand folgender Eigenschaften der Tregs ermöglicht: Tregs sind CD4<sup>+</sup>, weil sie Rezeptoren für MHC II Moleküle besitzen und CD25<sup>+</sup>, weil sie die  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors auf ihrer Oberfläche tragen. Durch die Eigenschaft, dass nTregs den Transkriptionsfaktor FoxP3 exprimieren, können sie am deutlichsten von anderen T Zellpopulationen abgegrenzt werden. nTregs differenzieren aus naiven T Zellen unter Anwesenheit von TGF- $\beta$ 1 und sezernieren IL10, IL-4 und TGF- $\beta$ 1 [57].

Es wurde in Studien nachgewiesen, dass nTregs eine Schlüsselrolle bei der Immunregulation zukommt. nTregs können sowohl die Aktivierung als auch die Effektorfunktion von autoreaktiven T Zellen, die der Toleranzentwicklung entkommen sind, supprimieren [22].

Somit spielen nTregs eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der immunologischen Selbsttoleranz und der Immunhomöostase [58]. Bei Nichtvorhandensein von nTregs oder Mutationen im FoxP3 Gen treten überschießende Immunreaktionen auf, die spontan zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen, Allergien und einer gestörten Immunität, sowohl bei Menschen als auch bei Mäusen, führt [59, 60].

Untersuchungen zeigten, dass nTregs in Mäusen und Ratten fähig sind, die Entwicklung von Autoimmungastritiden zu verhindern, nachdem diese drei Tage nach der Geburt thymektomiert worden waren [61].

Des Weiteren ist bekannt, dass nTregs durch Sekretion von IL-10 *in vivo* die Proliferation weiterer T Zellen verhindert [62]. Ferner haben *in vitro*-Versuche demonstriert, dass nTregs fähig sind, die T Zellaktivierung zu inhibieren [63] und autoaggressive T und B Zellen zu kontrollieren [64].

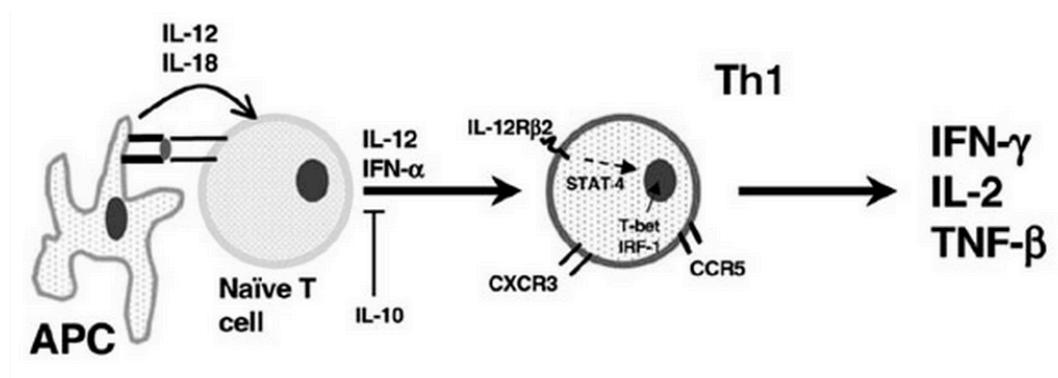
Weitere Experimente legten dar, dass Tregs anerg sind und die Suppressorfunktion von Tregs nicht über die Zytokine IL-4, IL-10 oder TGF- $\beta$  vermittelt ist, sondern über direkten Zell-Zell-Kontakt [64].

In einer Studie wurde außerdem beschrieben, dass Tregs die Differenzierung von naiven T Zellen zu pathogenen Th1 Zellen inhibieren [65] sowie nach Aktivierung über den TCR die Proliferation von  $CD4^+$  UND  $CD8^+$  T Zellen supprimieren können [66].

### 1.2.2 Th1 Zellen

Naive T Zellen werden von APCs – hauptsächlich dendritischen Zellen und Makrophagen – über den TCR mithilfe des MHC II Komplexes aktiviert. APCs, welche aufgrund ihrer Aktivierung IL-12 ausschütten, führen zur Proliferation und Differenzierung von Th1 Zellen [67].

Abbildung 3 stellt schematisch den Mechanismus der Th1 Zelldifferenzierung dar [68].



**Abb. 3 Th1 Differenzierung**

Die Abbildung zeigt schematisch Signalwege, die zur Th1 Differenzierung beitragen. Wichtige Transkriptionsfaktoren, Zytokine, Zytokinrezeptoren und Chemokinrezeptoren sind dargestellt.

Th1 Zellen produzieren die proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-2 und TNF- $\beta$  (Lymphotoxin- $\alpha$  = LT $\alpha$ ) [69]. Diese Zytokine aktivieren Makrophagen und  $CD8^+$  zytotoxische Zellen, IgG produzierende B Zellen und weitere IFN- $\gamma$  sezernierende  $CD4^+$  T Zellen, welche zur Aufrechterhaltung einer Entzündung beitragen [59].

Es ist bekannt, dass Th1 Zellen die Transkriptionsfaktoren T-bet, Stat1 und Stat4 exprimieren. T-bet stellt den Hauptregulator für die Th1 Differenzierung

dar [70], wohingegen sich Stat1 als Hauptübermittler von IFN- $\gamma$  Signalen erweist. Folglich ist Stat1 für die IFN- $\gamma$  abhängige Induktion von T-bet in aktivierten CD4<sup>+</sup> Zellen verantwortlich [71]. Des Weiteren ist Stat4 für die Transduktion von IL-12 Signalen verantwortlich und bedeutsam für die Verstärkung der Th1 Antwort [72, 73]. Darüber hinaus kann Stat4 direkt die IFN- $\gamma$  Produktion in aktivierten CD4 T Zellen induzieren, die über einen positiven Feedbackmechanismus zur verstärkten IFN- $\gamma$  abhängigen Aktivierung von T-bet führt und somit zur weiteren Ausschüttung von IFN- $\gamma$  [70, 74].

IL12/Stat4 können unabhängig von einer Aktivierung über den TCR die Produktion von IFN- $\gamma$  auslösen. Das Fehlen von Signalen über den TCR führt dazu, dass T-bet die Expression von IL-12 $\beta$ 2 Rezeptoren, welche sich auf der Oberfläche von Th1 Zellen befinden, induziert. Des Weiteren wird das Ansprechen von Th1 Zellen gegenüber IL-12 verstärkt, wodurch wiederum die T-bet Expression hochreguliert wird [74–76]. Dadurch, dass die Expression vom IL-12R Komplex hochreguliert wird, resultiert bei aktivierten Zellen eine Hyperreagibilität gegenüber IL-12 [77].

Auf der Oberfläche von Th1 Zellen befinden sich außerdem die Chemokinrezeptoren CXCR3 [78, 79] und CCR5 [80], welche für die Chemotaxis von Bedeutung sind.

Eine weitere Eigenschaft von IL-12 ist die Aktivierung von NK Zellen zur Produktion von IFN- $\gamma$ . Dadurch kann IFN- $\gamma$  in den CD4<sup>+</sup> Zellen den Transkriptionsfaktor Stat1 aktivieren, was eine Hochregulierung der Expression von T-bet zur Folge hat. T-bet wiederum führt zur Expression von IFN- $\gamma$  in den Th1 Zellen und reguliert den IL-12R $\beta$ 2 hoch. Diejenigen T Zellen, welche den IL-12R $\beta$ 2 exprimieren und hohe Spiegel von T-bet aufweisen, können durch IL-12 zu Th1 Zellen differenzieren. IL-12 kann über die Aktivierung von Stat4 die IFN- $\gamma$  Produktion induzieren und die Expression von IL-12R $\beta$ 2 aufrechterhalten. Folglich ist das Zusammenwirken von IFN- $\gamma$  und IL-12 für die vollständige Th1 Differenzierung notwendig [81].

Zu einem späteren Zeitpunkt der Th1 Differenzierung werden IL-18 $\alpha$  Rezeptoren hochreguliert. Die Hochregulation von IL-18R $\alpha$  benötigt Signale von

IL-12/Stat4 und wird durch IFN- $\gamma$  verstärkt. IL-12 und IL-18 induzieren zusammen die Produktion von IFN- $\gamma$  durch Th1 Zellen ohne TCR Stimulierung. Derartige Antigen-unabhängige Zytokinsekretionen sind wahrscheinlich wichtig für erweiterte Th1 Antworten durch Rekrutierung anderer bereits existierender Th1 Zellen [82].

*In vitro*-Studien zeigten, dass Prostaglandine E2 (PGE2) direkt auf T Zellen wirken und die Differenzierung von Th1 Zellen fördern [83].

Die Hauptfunktion von Th1 Zellen ist die Immunabwehr gegen intrazelluläre Bakterien und Virusinfektionen. Th1 Zellen schütten IFN- $\gamma$  aus, wodurch Makrophagen aktiviert werden und intrazelluläre Erreger, die sich in den Makrophagen befinden (z. B. Mykobakterien) durch Phagozytose und lysosomale Verdauung eliminieren können [84]. Dadurch ist es möglich, Krankheiten wie Lepra und Tuberkulose zu bekämpfen [85, 86].

Insgesamt gelten Th1 Zellen als sehr entzündungsfördernd und werden mit der Entstehung und Progression von vielen Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht [87].

### **1.2.3 Th17 Zellen**

Die Differenzierung naiver T Zellen zu T Helfer Zellen vom Th17-Typ wird durch TGF- $\beta$  in Kombination mit dem proinflammatorischen Zytokin IL-6 induziert, weil der Transkriptionsfaktor retinoid-related orphan Rezeptor (ROR) gamma T aktiviert wird [88].

Th17 Zellen produzieren die proinflammatorischen Zytokine IL-17A, IL-17F, IL-23, IL-22, den Oberflächenrezeptor IL-23R und die Chemokinrezeptoren CCR6 und CCR4 [89, 90]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass IL-23 die Expression von den Zytokinen und Chemokinen IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-26, IFN- $\gamma$  und CCL 20 (der Ligand von CCR6) reguliert [90].

Für die Aufrechterhaltung von murinen Th17 Zellen ist das Zytokin IL-23 bedeutend und aktiviert – wie IL-6 – den Transkriptionsfaktor Stat3, der für die Entwicklung von Th17 Zellen notwendig ist [91].

Des Weiteren wird IL-21, welches ein Aktivator von Stat 3 darstellt, von Th17 Zellen produziert und kann gleichzeitig in einem autokrinen Feedback Mechanismus die Entstehung von Th17 Zellen induzieren [92–94].

Außerdem wurde in Studien gezeigt, dass IL-1 ein starker Induktor von IL-17 Expression in aktivierten humanen CD4<sup>+</sup> T Zellen ist, obwohl IL-1 nur vorübergehend ROR $\gamma$ T aktiviert. IL-6 und IL-1 zusammen führen zur Aufrechterhaltung der ROR $\gamma$ T Expression und zur Sekretion von IL-17 und IFN- $\gamma$  [95].

Des Weiteren ergaben *in vitro*-Untersuchungen, dass Prostaglandine E2 die Proliferation von Th17 Zellen induzieren können [83] und TNF- $\alpha$  *in vitro* zur Bildung von IL-17 führt [96].

Ein weiterer Aspekt ist, dass aktivierte CD14<sup>+</sup> Monozyten die Differenzierung zu Th17 Zellen fördern, nicht jedoch zu Th1 oder Th2 Zellen [97].

Überraschenderweise konnten *in vivo* aktivierte Monozyten die intrazelluläre IL-17 Expression über Zell-Zell-Kontakte unabhängig von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , induzieren. Demgegenüber waren Th17 Zellen, die von Monozyten, die *in vitro* mit Lipopolysacchariden aktiviert worden waren, von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  abhängig. Es wird angenommen, dass bei Menschen neu rekrutierte CD4<sup>+</sup> Gedächtnis T Zellen nach Zell-Zell-Kontakt mit aktivierten Monozyten die IL-17 Sekretion in nichtlymphatischem entzündetem Gewebe induzieren können.

Verschiedene Signalwege werden abhängig von der Lage oder Richtung der APCs für die Erzeugung von Th17 Antworten *in situ* genutzt [97].

Die Hauptfunktion von Th17 Zellen ist es, die antimikrobielle Immunität auf Epithelien und Schleimhautbarrieren aufrechtzuerhalten, indem sie extrazelluläre Erreger wie Bakterien (Staphylokokken) oder Pilze (Candida) durch Zytokine bekämpfen. Sie sind verantwortlich für die Induktion von organspezifischen Autoimmunerkrankungen oder nehmen an ihnen teil [98]. Außerdem konnte in Untersuchungen von Patienten mit Immunschwäche nachgewiesen werden, dass das Fehlen von Th17 Zellen die Entwicklung von opportunistischen Infektionen begünstigte [99].

*In vitro*-Studien stellten dar, dass für die Th17 Differenzierung der Interferon Regulator Faktor 4 (IRF4) eine Rolle spielt, weil Mäuse die IRF4-defizient sind, keine Th17 Zellen und keine experimentell induzierte Autoimmunenenzephalitis entwickelten [100].

Darüber hinaus bewiesen Experimente mit Mäusen, dass IL-23 maßgeblich an der Entstehung von autoimmunen Erkrankungen wie autoimmuner Enzephalomyelitis, CEDs und Kollagen-induzierter Arthritis beteiligt ist [101–104].

Besonders IL-17 hat bei rheumatischen Erkrankungen eine wichtige Bedeutung, da sich IL-17 Rezeptoren an der Synovialmembran befinden und das Binden von IL-17 an die spezifischen Rezeptoren zur Zerstörung des Knorpelgewebes führt [105].

Zellen, die den IL-17 Rezeptor exprimieren, sind an der Entstehung und Aufrechterhaltung der Gelenkentzündung beteiligt. Darunter fallen Th17 Zellen, CD8<sup>+</sup> T Zellen, NK Zellen [106].

Bemerkenswert ist, dass in der Synovialflüssigkeit bei JIA Patienten mehr IL-17 produzierende Zellen vorhanden sind als im Peripherblut und die Krankheitsaktivität mit dem Anteil an synovialen Th17 Zellen korreliert [107, 108].

Zusammenfassend wird vermutet, dass Th17 Zellen aufgrund ihrer Zytokinsekretion eine wichtige Rolle bei Gelenkentzündungen spielen.

#### **1.2.4 Th1/Th17 Zellen**

Wie in 1.2.2 und 1.2.3 dargestellt, entscheiden Einflüsse aus der Umwelt, Antigene und Zytokine über die Entwicklung der CD4<sup>+</sup> Zellen.

Untersuchungen legten dar, dass Th1 oder Th17 differenzierte Zellen plastisch sind [49] und IFN- $\gamma$  Th1 / IL-17 Th17 doppelt positive Zellen existieren.

Weitere Studien belegten, dass das Zusammenwirken von Th1 und Th17 Zellen die Abwehrfunktion unterstützt [109]. Ferner legen einige Erkenntnisse nahe, dass eine frühe Th17 Antwort die Rekrutierung von Th1 Zellen an den Infektionssort erleichtert und die Entstehung von Th1 Gedächtniszellen fördert [110].

Dem Wechselspiel zwischen Th1 und Th17 Zellen liegen Mechanismen zugrunde, die genauer erforscht werden müssen [111].

### 1.3 Ausgangspunkt und Zielsetzung

Es ist bekannt, dass CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatorische Zellen eine entscheidende Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase und die Erhaltung der Selbsttoleranz haben [112, 113]. Es wird vermutet, dass Tregs bei der Pathogenese und Krankheitsaktivität der JIA einen krankheitslimitierenden Effekt ausüben. Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, ob Therapeutika, die in die Signaltransduktionskaskade der Entzündungsentstehung eingreifen, einen Einfluss auf den Anteil an Tregs im peripheren Blut von Patienten mit Arthritis haben.

Ausgangspunkt hierfür war die Studie von Dr. Susanne Haufe, in welcher *in vitro*-Versuche zeigten, dass durch die Stimulation von CD4<sup>+</sup> T Zellen mit Etanercept funktionale CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Tregs induziert werden können.

Es wird davon ausgegangen, dass Th17 Zellen durch die Sekretion von IL-17 im Gelenk proinflammatorisch wirken und zur Knorpeldegeneration beitragen. Deshalb war ein weiteres Ziel der Arbeit, den therapeutischen Effekt von TNF- $\alpha$  Inhibitoren auf die Th17 Zellen *in vivo* zu untersuchen.

Um die Wirkung von Th17 Zellen *in vivo* zu demonstrieren, wurde in früheren Arbeiten dargelegt, dass die IL-17-Sekretion von Th17 Zellen sowohl vom Aktivierungszustand als auch von der anatomischen Lokalisation der APCs abhängig sind. Außerdem konnten *in vivo* aktivierte Monozyten aus entzündeten Gelenken von Patienten mit aktiver RA isoliert werden. Es wurde festgestellt, dass die aktivierten CD14<sup>+</sup> Monozyten spontan und spezifisch die Differenzierung zu Th17 Zellen fördern, aber nicht zu Th1 oder Th2 Zellen, im Vergleich zu nicht aktivierten CD14<sup>+</sup> Monozyten im Blut [97]. Deshalb war ein weiteres Ziel zu überprüfen, ob *in vivo* aktivierte Monozyten die IL-17 Sekretion von Th17 Zellen *in vitro* induzieren können.

Zusammenfassend sollte der Einfluss von verschiedenen Medikamenten, insbesondere von TNF- $\alpha$  blockierenden Substanzen wie Etanercept, auf die Balance von proinflammatorischen Th17/Th1 Zellen (Teffs) und immunregulatorischen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Regulationszellen (Tregs) bei Patienten mit JIA analysiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Patienten und gesunde Spender

Die Patientenblutproben wurden von Patienten der Kinderklinik Tübingen (Rheumaambulanz) und des Olgahospitals Stuttgart entnommen. Die Blutentnahmen erfolgten im Rahmen der medizinisch indizierten Routineuntersuchungen, es wurde kein Blut ausschließlich zu Studienzwecken abgenommen. Ein Ethik-Votum für die Studie liegt von der Ethik-Kommission der Universität Tübingen vor. Es erfolgte eine Aufklärung über die Studienteilnahme, die Aushändigung einer Informationsschrift für Eltern und Patienten und die Einholung der Unterschrift auf der Einverständniserklärung. Für die Untersuchungen wurden 5–10 ml venöses Blut benötigt. Es wurden Proben von insgesamt 29 Patienten im Alter von 4 bis 20 Jahren mit Juveniler Idiopathischer Arthritis untersucht, die entweder mit Methotrexat alleine oder Methotrexat in Kombination mit Etanercept oder anderen TNF- $\alpha$  Inhibitoren behandelt wurden.

Zur Kontrolle wurde 20 ml Blut von freiwilligen, gesunden, volljährigen Spendern untersucht bzw. Buffy-Coats aus der Transfusionsmedizin verwendet.

Es galt ausschließlich das Freiwilligkeitsprinzip. Die Proben wurden mittels Nummerierungen pseudonymisiert.

#### 2.1.2 Geräte

autoMACS® Pro Separator

Brutschrank HERA Cell

Durchflusszytometer FACS Calibur™

Miltenyi Biotec

Heraeus Holding GmbH

BD Biosciences

Inversmikroskop LM Olympus IX50	Olympus
Cryovial	Thermo Fisher Scientific
Kryobox	
Neubauer Zählkammer	La Fontaine International
Pipetten LABMATE™	ABIMED GmbH
Standardzentrifuge Rotixa 50RS	Andreas Hettich GmbH & Co.KG
Sterilwerkbank HERAsafe	Heraeus Holding GmbH
Vortexer Reax Top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Einfrierröhrchen (1,2 ml)	Corning Incorporated
Einmalpipetten (5 ml; 10 ml; 25 ml)	Corning Incorporated
Eppendorfröhrchen Safe-Lock (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf
FACS-Röhrchen (5 ml)	BD Biosciences
Polypropylen-Röhrchen (15 ml)	Greiner Bio-One
Polypropylen-Röhrchen (50 ml)	BD Biosciences
MACS® Separationssäulen	Miltenyi Biotec
Pipettenspitzen (10 µl)	Greiner Bio-One GmbH
Pipettenspitzen (100, 200 µl)	Labnet International
Pipettenspitzen (1 ml)	Sarstedt AG & Co.
Zellkulturplatten (96 Loch-Flachboden, steril)	Corning Incorporated

## 2.1.4 Chemikalien

### Reagenzien, Chemikalien und Lösungen

Ampuwa® Wasser	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich
FACS® Clean	BD Biosciences
FACS® Flow	BD Biosciences
FACS® Rinse	BD Biosciences
Ionomycin	Sigma-Aldrich
Monensin	eBioscience
Natriumchlorid	Merck KGaA
Phorbol myristate acetat (PMA)	Sigma-Aldrich
Phosphate buffered saline (PBS)	Biochrom AG
Trypanblau	Sigma-Aldrich

### Puffer – Fertigpuffer

10 x eBioscience Permeabilization Buffer	eBioscience
autoMACS™ Pro Running Buffer	Miltenyi Biotec
autoMACS™ Pro Washing Buffer	Miltenyi Biotec
eBioscience IC Fixation Buffer	eBioscience
FOXP3 Fix/Perm Buffer Set	BioLegend
Perm Buffer III	BD BioSciences

**Puffer – Selbsthergestellte Puffer**

FACS Puffer	PBS + 2% FCS
Lysepuffer	1mM EDTA
MACS Puffer	PBS + 0,5 % humanes Serum- Albumin + (HSA) + 2 mM EDTA (pH8)

**Reagenzien und Medien für Zellkulturen**

CD14 MicroBeads	Miltenyi Biotec
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG
Einfriermedium	90% FCS + 10% DMSO
HEPES Puffer (1M)	Biochrom AG
L-Glutamin (200mM)	Biochrom AG
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG

**Antikörper**

Spezifität	Isotyp	Markierung	Klon	Hersteller
<b>für die Zellkultur</b>				
anti-human CD3, Orthoclone OKT3, muromonab- CD3	Maus, IgG2a auf- gereinigt	OKT3		Janssen- Cilag

## für die Durchflusszytometrie

anti-human CD3	Maus, IgG2a, κ	FITC	HIT3a	BioLegend
anti-human CD4	Maus, IgG1, κ	PE	RPA-T4	BioLegend
anti-human CD4	Maus, IgG1, κ	PerCP	SK3	BDBiosciences
anti-human CD4	Maus, IgG1, κ	APC	OKT4	BioLegend
anti-human CD25	Maus, IgG1, κ	PE	M-A251	BDBiosciences
anti-human FOXP3	Maus, IgG1, κ	AlexaFluor647	259D	BioLegend
anti-human IL- 17A	Maus, IgG1, κ	AlexaFluor647	eBio64DEC17	eBioscience
anti-human IFN-γ	Maus, IgG1, κ	FITC	4S.B3	eBioscience
Isotypkontrolle	Maus, IgG2a, κ	FITC	MOPC-173	BioLegend
Isotypkontrolle	Maus, IgG1, κ	FITC	MOPC-21	BioLegend
Isotypkontrolle	Maus, IgG1, κ	PE	MOPC-21	BioLegend
Isotypkontrolle	Maus, IgG1, κ	PerCP	MOPC-21	BioLegend
Isotypkontrolle	Maus, IgG1, κ	AlexaFluor647	MOPC-21	BioLegend

Protein				
Rekombinantes humanes STAT3	Maus, IgG1, κ	PE	M59-50	BDBiosciences

### 2.1.5 Software

BD CellQuest™ Pro Version 4.0.2	BD Biosciences
CellQuest™	Version 3.3 Becton Dickinson
GraphPad Prism Version 4.01	GraphPad Software Inc.
Microsoft Office	Microsoft

### 2.1.6 Firmenverzeichnis

BD Biosciences	San Jose, CA, USA
BioLegend	San Diego, CA, USA
Biochrom	Berlin, Deutschland
eBioscience	San Diego, CA, USA
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Fresenius Kabi	Bad Homburg, Deutschland
GraphPad Software	La Jolla, CA, USA
Heraeus Holding GmbH	Hanau, Deutschland
La Fontaine International GmbH	Waghäusel, Deutschland
Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Microsoft	Redmond, WA, USA
Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
R&D Systems	Minneapolis, MN, USA

Sigma-Aldrich

Saint Louis, MO, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Isolation mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Um periphere mononukleäre Zellen (PBMCs) aus Vollblut oder Blutkonzentraten zu isolieren, wird eine Dichtegradientenzentrifugation mit einer Ficoll-Hypaque Lösung durchgeführt. Nach der Zentrifugation bilden sich vier Phasen: die erste entsteht durch Absinken von Erythrozyten, Granulozyten und toten Zellen auf den Bodengrund der Röhrrchen aufgrund der höheren Dichte. Die zweite Phase beinhaltet die Ficoll-Lösung. Die dritte Phase, die sog. Interphase, besteht aus den mononukleären Zellen, welche einen deutlich abgrenzbaren Ring bilden, wodurch man diese gut abnehmen kann. Das Serum befindet sich auf der Oberfläche und bildet die vierte Phase.

Bei frisch gewonnenem Spenderblut wurde das Blut auf zwei 50 ml Röhrrchen aufgeteilt und in einem 1:1 Verhältnis auf die Ficoll-Lösung geschichtet.

Für Blutkonzentrate (Buffy-Coats) eignete sich eine 1:1 Verdünnung mit Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), bevor sie in einem 1:1 Verhältnis auf die Ficoll-Lösung pipettiert wurden.

Die Proben wurden dann bei 20° Celsius, auf Anlauf- und Auslaufstufe 2 (Stufe 1 (langsam) – 9 (schnell)) und 2020 RPM (rounds per minute), 20 Minuten lang zentrifugiert.

Danach wurden die Proben dreimal mit PBS mit 2 % FCS (Fetales Kälberserum) gewaschen. Die Waschschrirte wurden bei 20° Celsius auf Anlauf- und Auslaufstufe 9 bei 1300 RPM 5 Minuten lang durchgeführt. Der Überstand wurde jeweils abgesaugt und der verbleibende Zellkuchen (Pellet) weiterverarbeitet.

Bei unsaubereren Proben, d. h. mit einem hohen Anteil an Erythrozyten, wurde die Probe in Lysepuffer resuspendiert (2 ml) und nach 4 Minuten Einwirkzeit mit PBS gewaschen (5 Min, 1300 RPM, 20° C).

Damit die Gesamtzahl der PBMCs bestimmt werden konnte, wurde das Pellet in 10 ml PBS mit 2 % FCS resuspendiert und eine kleine Probe davon mit Trypanblau in einem Verhältnis 1:3 bei Frischblut und in einem Verhältnis 1:30 bei Blutkonzentraten verdünnt. Die Probe wurde sodann auf die Zählkammer gestrichen und unter einem Lichtmikroskop gezählt.

Durch Zählen der Zellen in einem Quadranten war die Berechnung der Anzahl der PBMCs pro ml anhand der Formel: Anzahl der Zellen in einem Quadranten x Verdünnungsfaktor x 10.000 möglich. Das Ergebnis multipliziert mit der Gesamtprobenmenge im Probenröhrchen ergab die totale Anzahl der PBMCs.

### **2.2.2 Durchflusszytometrie**

Um die Zellen phänotypisch zu charakterisieren, wurde ein Durchflusszytometer (Fluorescence activated cell sorting, FACS-Gerät) verwendet. Hierbei werden die Zellen durch das Gerät eingesaugt und einzeln detektiert. Die Zellen emittieren Lichtsignale beim Passieren eines dualen Laserstrahls (aus Helium-Neon und Argon bei 633 nm und 488 nm Wellenlänge). Das Vorwärtsstreulicht (FSC – forward scatter), das entlang des Laserstrahls streut, ermöglicht eine Aussage über das Volumen einer Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (SSC – side scatter, Brechung des Lichtes an Strukturen der Zelle im rechten Winkel) gibt Hinweise auf die Granularität der Zelle. Die Bindung fluorchrommarkierter Antikörper an Antigene führt bei Absorption der Laserstrahlung zur Emission eines Fluoreszenzlichtes. Dessen Stärkung entspricht der Anzahl der Bindungen und lässt weitere Charakterisierungen der Zelle zu. Um eine Überlappung der einzelnen Emissionsspektren zu kompensieren, wurde das Gerät vor der Messung mit einfach gefärbten Zellen geeicht.

Das im Labor verwendete Gerät ermöglichte eine parallele Aufzeichnung von vier unterschiedlichen Emissionsspektren der Fluorchromfarbstoffe, welche in verschiedenen Kanälen detektiert wurden:

Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	FL1-Kanal
Phycoerythrin (PE)	FL2-Kanal
Peridinin Chlorophyll (PerCP)	FL3-Kanal
Allophycocyanin (APC) und AlexaFluor 647	FL4-Kanal

Es wurden 10.000 bis 50.000 Zellen gemessen, die weitere Analyse der automatisch gespeicherten Daten erfolgte mit dem Computerprogramm CellQuest Pro.

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Darstellung der Zellen aufgrund ihres Volumens (FSC) und ihrer Granularität (SSC) in einem Dichteplot (s. 2.2.2). Vitale Lymphozyten (T-, B-, NK-Zellen) streuen wenig Licht, weil sie klein und glatt sind und wurden als Region R1 definiert und eingegrenzt (Abb. 1A).

### 2.2.3 Charakterisierung von regulatorischen T Zellen

#### 2.2.3.1 Oberflächenmarkierung von regulatorischen T Zellen

Nach der Isolation wurde das errechnete Volumen für 100.000 bzw. 300.000 PBMCs in FACS Röhren überführt und mit 1 ml PBS + 2 % FCS gewaschen (5 Min, 1300 RPM, 20° C). Nachdem die Zellen im FACS-Röhren resuspendiert wurden, erfolgte die Oberflächenfärbung.

Für die Isotypenkontrolle dienten IgG2-FITC, IgG1-PE und IgG1-PerCP Antikörper und für die Proben anti-CD3-FITC, anti-CD25-PE und anti-CD4-PerCP Antikörper zur Markierung der entsprechenden Oberflächenantigene der T Zellen. Nachdem die Zellen mit den Antikörpern 15–20 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubierten, wurden sie anschließend mit kaltem PBS + 2 % FCS (5 Min, 1300 RPM, 20° C) gewaschen.

#### 2.2.3.2 Detektion des intrazellulären Transkriptionsfaktors FOXP3

Um den Transkriptionsfaktor FOXP3 in CD4+CD25+ regulatorischen T Zellen zu detektieren, wurden die Zellen nach dem standardisierten Protokoll der

Firma BioLegend angefärbt. Bevor die Intrazellulärfärbung durchgeführt werden konnte, wurden die Zellen mit einem frisch hergestellten Fixierungs-/Permeabilisierungspuffer stabilisiert und durchlässig gemacht: Hierfür wurde der FOXP3 Fix/Perm buffer (4x) mit PBS auf 1 verdünnt.

Es wurde 1 ml FOXP3 Fix/Perm buffer (1x) zu den Proben gegeben. Diese wurden anschließend mithilfe eines Schüttlers (Vortex) resuspendiert und 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben zentrifugiert (5 Min, 1300 RPM, 20° C), der Überstand abgekippt und mit 1 ml PBS+2 % FCS gewaschen. Nun wurden die Zellen in einem frisch hergestellten FOXP3 Permeabilisierungspuffer (FOXP3 Perm buffer (10x) in PBS auf 1 verdünnt) in 1 ml FOXP3 Perm buffer (1x) gewaschen, zentrifugiert, der Überstand verworfen und ein weiteres Mal in 1 ml FOXP3 Perm buffer (1x) gewaschen, durch Vortexen resuspendiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (5 Min, 1300 RPM), der Überstand verworfen und die Zellen in 100 µl FOXP3 Perm buffer (1x) resuspendiert und 3 µl Fluorchrom markierte anti-FOXP3 Antikörper hinzugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Abschließend wurden die Zellen zweimal in 2 ml PBS + 2 %FCS gewaschen (5 Min, 1300 RPM, 20° C), der Überstand abgeschüttet und 50.000 Zellen im FACS-Gerät gezählt.

Danach wurden die CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T Zellfraktion, also die T-Helferzellen und regulatorischen T Zellen, aufgereinigt. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch nach Fluoreszenzmarkierung der Oberflächenantigene CD4, CD25 und des intrazellulären Transkriptionsfaktors FOXP3, um die gesuchten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatorischen T Zellen identifizieren zu können. Die Markierung von FOXP3 schaffte die Voraussetzung, regulatorische T Zellen gegenüber den T-Helferzellen abzugrenzen.

#### **2.2.4 Isolation der Monozyten mittels CD14-Microbeads aus Peripherblut**

Für die Isolation der Monozyten wurde das Gerät autoMACS Pro Separator benutzt, welches mit der MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) Methode

arbeitet: Hierbei sind Magnetpartikel an Antikörper gebunden, die spezifische Oberflächenantigene erkennen. Das Zellgemisch durchwandert eine Säule, die von einem starken Magnetfeld umgeben ist. Dieses Magnetfeld zieht die magnetisch markierten Zellen an (positive Selektion), während die nicht markierten Zellen die Säule passieren (negative Selektion). Nachdem das Magnetfeld von der Säule entfernt wurde, können die gesuchten Zellen ausgewaschen und in einem Behälter isoliert werden. Durch Verwendung von anti-CD14 Antikörper gekoppelte Partikel können CD14+ Monozyten durch positive Selektion gewonnen werden.

Zur MACS-Aufbereitung der Probe wurden die verbliebenen PBMCs von den Patientenproben genommen und  $0,8 \times 10^7$  PBMCs vom gesunden Spenderblut, wobei davon ausgegangen wurde, dass 5–10 % der darin enthaltenen Zellen Monozyten sind. Dieser Ansatz war nötig, um genügend Zellen für die Bestimmung IL-17 sezernierender Zellen zu haben.

Diese Probe wurde 10 Minuten lang bei 4° Celsius zentrifugiert, auf Anlauf- und Auslaufstufe 9 und bei 1300 RPM. Der Überstand wurde vollständig mit einer Pipette abgenommen, das Zellpellet in 80 µl MACS Puffer pro  $10^7$  Zellen resuspendiert und 20 µl CD 14 MicroBeads pro  $10^7$  Zellen dazugegeben. Die Proben wurden resuspendiert und 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1–2 ml MACS Puffer pro  $10^7$  Zellen (5 Min, 1300 RPM, 4 °C) gewaschen, der Überstand vollständig mit einer Pipette abgenommen und  $10^8$  Zellen in 500 µl MACS Puffer resuspendiert.

Die Proben wurden in den autoMACS Pro Separator gebracht und mit dem Programm „Posselds“ positive Selektion im sensitiven Modus, bei welchem die Zellen zwei Säulen durchlaufen, die CD14+ Monozyten separiert. Um die Reinheit zu bestimmen, wurden 50–100 µl aus den isolierten CD14+ Zellen entnommen, mit 3 µl CD14-FITC markiert und später im FACS analysiert.

### 2.2.5 Bestimmung IL-17 und sezernierender Zellen

Um die Monozyten-induzierte IL-17 Produktion durch T Zellen zu untersuchen, wurden Monozyten von jeweils gesunden Spendern und Patienten mit CD4+ T Zellen in einem Verhältnis von 1:10 (Monozyten:PBMCs) ko-kultiviert.

Das benötigte Volumen für 200.000 PBMCs pro Versuchsansatz wurde in 15 ml Röhrchen überführt.

Nach Isolation der Monozyten wurde deren Anzahl mittels Zählkammer bestimmt und das benötigte Volumen in Versuchsröhrchen überführt. Im Allgemeinen wurden 140.000 Monozyten eingesetzt, was 20.000 Monoyzten pro Versuchsansatz entspricht.

Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (5 Min, 1300 RPM, 20 °C), das Pellet von den Patienten PBMCs und Monozyten in 700 µl Medium resuspendiert und das Pellet von den PBMCs des gesunden Spenders in 2000 µl Medium resuspendiert. Die Zellen wurden mit löslichem anti-CD3 Antikörper (100 ng/ml) (OKT3) ko-kultiviert: Es wurden 2 µl OKT3 in einer 1:10.000 Verdünnung mit Medium in die Löcher einer 96-Lochplatte mit flachem Boden pipettiert. Als OKT3 Ersatz wurde ab April 2012 anti-hu-CD3 in einer 1:10.000 Verdünnung mit Medium genommen.

Nun wurden 100 µl von den entsprechenden Zellen ausgesät und jeweils zwei Löcher, die mit OKT3 bzw. anti-hu-CD3 gefüllt waren, folgenderweise angesetzt:

- PBMCs vom gesunden Spender
- PBMCs vom Patienten
- PBMCs vom gesunden Spender ko-kultiviert mit Monozyten vom gesunden Spender
- PBMCs vom Patienten ko-kultiviert mit Monozyten vom Patienten
- PBMCs vom gesunden Spender ko-kultiviert mit Monozyten vom Patienten
- PBMCs vom Patienten ko-kultiviert mit Monozyten vom gesunden Spender

Des Weiteren wurden PBMCs vom gesunden Spender in weitere sechs Löcher ohne OKT3 angesetzt, um eine Wirkungsreferenz des OKT3 zu haben.

Da ein Gesamtvolumen von 200  $\mu$ l pro Loch erzielt wurde, wurde in einfach gefüllte Löcher je 100  $\mu$ l Medium dazugegeben. Abschließend wurden die Zellen in der 96-Lochplatte fünf bis sechs Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

### **2.2.6 Analyse IL-17 und IFN- $\gamma$ produzierender T Zellen**

Zur Analyse der Produktion von IL-17 und IFN- $\gamma$  durch T Zellen erfolgte eine Reaktivierung der Zellen in den Löchern der Versuchsplatte mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Ionomycin, welche die Proteinkinase C und die Sekretion von Zytokinen in T Zellen aktivieren. Hierfür wurden 5  $\mu$ l PMA in einer 1:20.000 Verdünnung mit PBS und 2,5  $\mu$ l Ionomycin in einer 1:1.000 Verdünnung mit PBS verwendet.

Nach zwei Stunden Inkubation im Brutschrank wurde mittels 2,5  $\mu$ l Monensin in einer 1:1.000 Verdünnung mit PBS der intrazelluläre Proteintransport blockiert. Nach weiteren drei Stunden Inkubationszeit wurde mit der Oberflächenfärbung begonnen. Dazu wurden die Zellen aus der Platte gelöst, in FACS-Röhrchen überführt, mit 2 ml PBS mit 2 % FCS gewaschen (5 Min, 1300 RPM, 20 °C), aufgeschüttelt, mit IgG1-PerCP bzw. anti-CD4-PerCP angefärbt und 15–20 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Röhrchen mit 2 ml kaltem PBS + 2 % FCS gewaschen (5 Min, 1300 RPM, 20 °C).

Um die Intrazellulärfärbung durchführen und die Expression von IL-17 nachweisen zu können, wurden die Zellen mit 100  $\mu$ l Fixation solution fixiert und 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Zur Permeabilisierung der Zellen wurde Permeabilization Buffer von 10x auf 1x in Ampuwa verdünnt und zweimal mit 0,5 ml 1xPerm Buffer pro Röhrchen (5 Min, 1300 RPM, 20 °C) gewaschen.

Nun wurden die intrazellulär markierenden Antikörper auf die Zellen gegeben: 5  $\mu$ l anti-IL-17-Alexa-Fluor in einer 1:1 Verdünnung mit 1x Perm Buffer, 3  $\mu$ l

anti-IFN- $\gamma$ -FITC in einer 1:7 Verdünnung mit 1x Perm Buffer, 15  $\mu$ l anti-Stat3-PE. Für die Isotypenkontrolle wurde in äquivalenter Menge IgG1-Alexa-Fluor, IgG1-FITC und IgG1-PE verwendet, 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, einmal mit 0,5 ml 1x Perm Buffer (5 Min, 1300 RPM, 20° C) und einmal mit 2 ml PBS+ 2 %FCS (5 Min, 1300 RPM, 20° C) gewaschen.

Abschließend erfolgte die Analyse im FACS.

### **2.2.7 Einfrieren von Zellen**

Nachdem die Schritte aus Kapitel 2.2.1 erfolgt waren, war es möglich, das Pellet in 1 ml 90 % FCS + 10 % DMSO zu resuspendieren, die Zellen sofort in Cryovial Röhren zu überführen und in einer CryoBox bei -80°C einzufrieren.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Nachweis von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatorischen T Zellen *ex vivo*

#### 3.1.1 Patientencharakteristika

In einigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatorische T Zellen die Zytokine TGF- $\beta$  und IL-10 ausschütten und die T Zeldifferenzierung inhibieren, wodurch sie antiinflammatorisch wirken [114]. Des Weiteren tragen sie zur Selbsttoleranz bei [115]. Daher wird vermutet, dass das Verhältnis von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatorischen T Zellen zu CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Effektor T Zellen eine wichtige Rolle spielt und eine Verschiebung zugunsten der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatorischen T Zellen den autoinflammatorischen Prozess vermindert [22].

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob unterschiedliche immunsuppressive Behandlungsformen den Anteil an CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Zellen im peripheren Blut von Patienten mit JIA beeinflussen. Dafür wurden Patienten mit JIA, die mit Methotrexat (MTX) alleine, in Kombination mit Etanercept oder Adalimumab oder mit einem TNF- $\alpha$  Inhibitor alleine behandelt wurden, nach Einwilligung (informed consent) in diese Studie aufgenommen. Zudem lag die Zustimmung der Ethikkommission der Universität Tübingen (Ethikantragsnummer: 154/2011BO1) vor. Eine Übersicht der in diese Studie eingeschlossenen Patienten ist in Tabelle 2 dargestellt.

**Tab. 2 Charakteristika der Patienten in der Studie**

ANA = anti-nukleärer Antikörper; MTX = Methotrexat; NSAR = nicht steroidale Antirheumatika;  
SEM= Standardfehler des Mittelwerts

	Persistent oligoartikulär	Extended oligoartikulär	Polyartikulär (seronegativ/ seropositiv)	JIA, andere
<b>Charakteristika Patienten mit MTX-Behandlung</b>				
Anzahl (Gesamtpatienten- zahl=7)	2 (28%)	-	1 (14%) (seronegativ)	4 (56%)
weiblich : männlich	2:0		1:0	4:0
mittleres Alter in Jahren (± SEM)	10		9	11
Anzahl (%) ANA+	1 (50%)		1 (100%)	2 (50%)
Anzahl (%) zusätzliche Behandlung mit NSAR	1 (50%)		0	25
<b>Charakteristika Patienten mit MTX+Etanercept-Behandlung</b>				
Anzahl (Gesamtpatientenzahl=4)	2 (50%)	-	-	2 (50%)
weiblich : männlich	1:1			2:0
mittleres Alter in Jahren (± SEM)	9,5			17
Anzahl (%) ANA+	2 (100%)			1 (50%)
Anzahl (%) zusätzliche Behandlung mit NSAR	1 (50%)			1 (50%)
<b>Charakteristika Patienten mit MTX+Adalimumab Behandlung</b>				
Anzahl (Gesamtpatientenzahl=3)	1 (33.3%)	1 (33.3%)	1 (33.3%) (seronegativ)	-
weiblich : männlich	1:0	1:0	1:0	
mittleres Alter in Jahren (± SEM)	11	13	10	
Anzahl (%) ANA+	1 (100%)	0	1 (100%)	
Anzahl (%) zusätzliche Behandlung mit NSAR	0	1 (100%)	0	

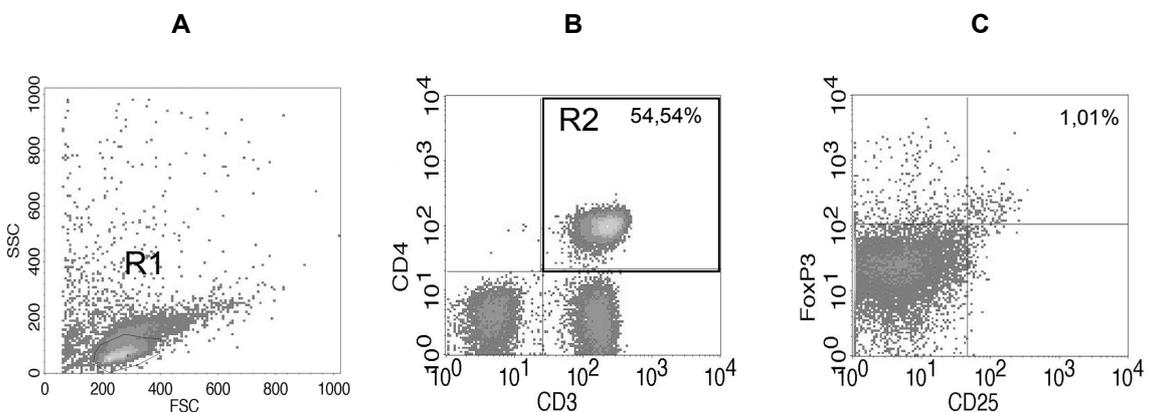
Der Stichprobenumfang von Patienten, die mit einem TNF- $\alpha$  Inhibitor alleine behandelt wurden, war zu gering, um in die Auswertung einbezogen werden zu können.

Um den Anteil an CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatorischen T Zellen zu bestimmen, wurden PBMCs aus dem peripheren Blut von JIA Patienten (n=14) sowie von gesunden Spendern (n=9) isoliert (s. 2.2.1). Anschließend wurde der Anteil an CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Zellen in den PBMCs mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

### 3.1.2 Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Auswertung eines gesunden Spenders

In Abbildung 4 ist exemplarisch die phänotypische Analyse der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatorischen T Zellen eines gesunden Spenders dargestellt.

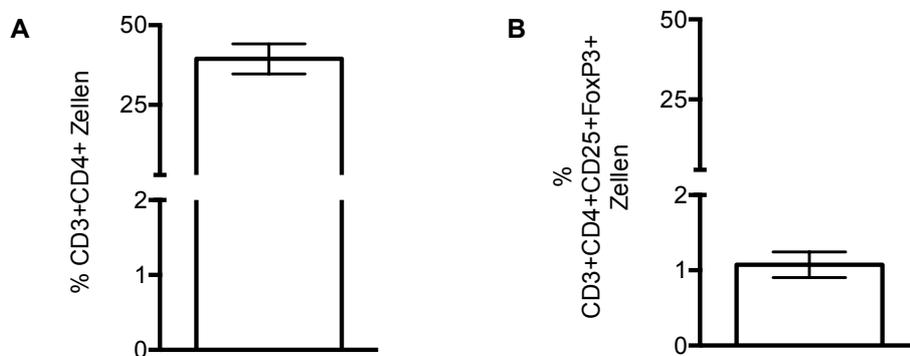
Mithilfe des nachfolgenden Dichteplots (Abb. 4B) wurde der Anteil an CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T Zellen innerhalb der Lymphozyten bestimmt. Diese CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T Zellen wurden in Region 2 (R2) definiert. Anschließend wurde der Anteil an CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T Zellpopulation bestimmt. Der durchschnittlich ermittelte Anteil an CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T Zellen betrug 39.45 % (Abb. 4B, Abb. 5A) und an CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatorischen Zellen 1.07 % bei den gesunden Spendern (n=9) (Abb. 4C, Abb. 5B).



**Abb. 4. Phänotypische Analyse der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatorischen T Zellen eines gesunden Spenders**

- A: FSC/SSC Dichteplot (FSC: x-Achse, SSC: y-Achse). Region 1 (R1) definiert die Lymphozytenpopulation.
- B: Der Anteil der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt und als Region 2 (R2) definiert.
- C: Der Anteil der CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt und befindet sich im rechten oberen Quadranten.

Abbildung 5 zeigt graphisch den Anteil an CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T Zellen (A) und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatorischen Zellen (B) bei gesunden Spendern.



**Abb. 5. Prozentualer Anteil der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T Zellen (A) und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatorischen Zellen (B) bei gesunden Spendern**

- A: Dargestellt ist der prozentuale Anteil der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T Zellen innerhalb der Lymphozyten bei gesunden Spendern.
- B: Gezeigt wird der prozentuale Anteil der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatorischen Zellen innerhalb der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T Zellen bei gesunden Spendern.

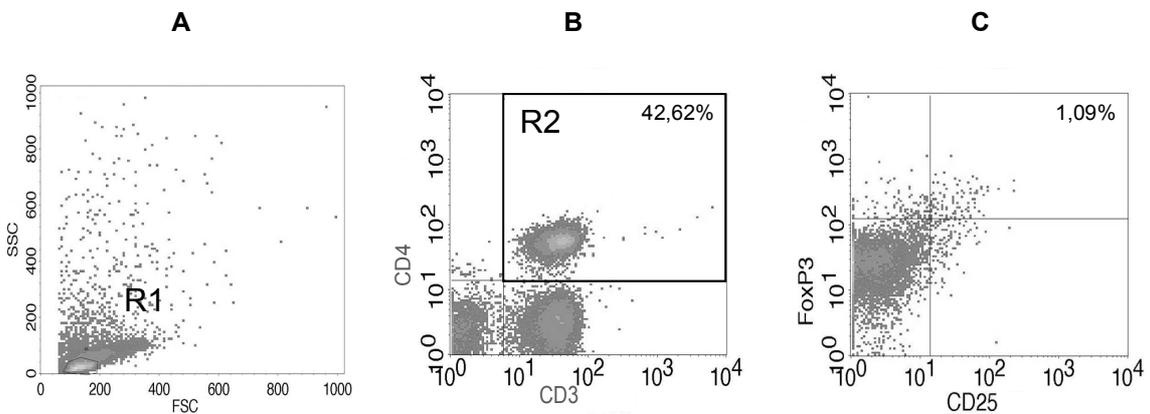
Die Daten zeigen die arithmetischen Mittelwerte, die vertikalen Linien den Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

### 3.1.3 Einfluss von Methotrexat *in vivo*

Zunächst wurde der Einfluss der Methotrexatgabe bei Patienten mit JIA auf den Anteil der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatorischen T Zellen im peripheren Blut untersucht.

Hierfür wurden PBMCs von JIA Patienten, die mit MTX behandelt wurden (n=7) und gesunden Spendern (n=9) (s.2.2.1) isoliert und der Anteil an  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  Zellen innerhalb dieser PBMCs durchflusszytometrisch ermittelt (s. 2.2.3).

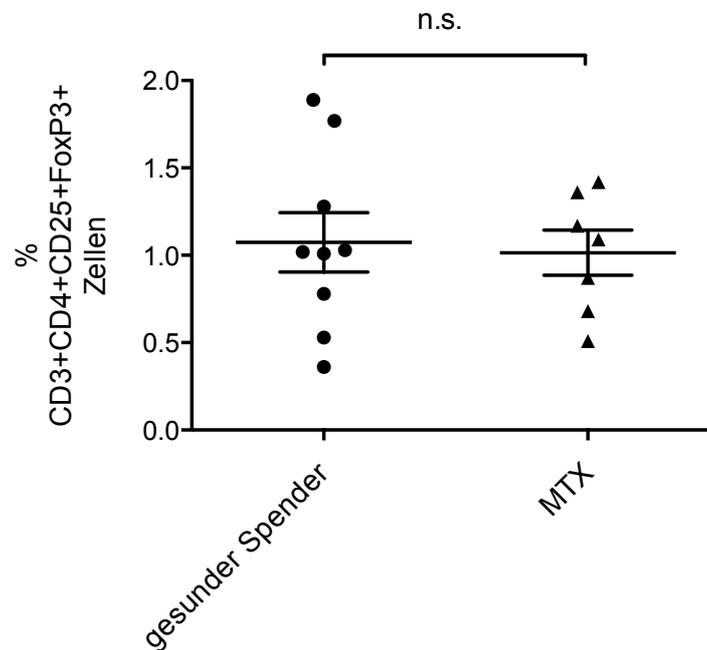
Die phänotypische Analyse der  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  regulatorischen T Zellen eines JIA Patienten mit MTX Behandlung ist exemplarisch in Abbildung 6 dargestellt. Die durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils an regulatorischen T Zellen innerhalb der Lymphozyten erfolgte wie oben beschrieben.



**Abb. 6. Phänotypische Analyse der  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  regulatorischen T Zellen eines JIA Patienten, der mit MTX behandelt wurde**

- A: FSC/SSC Dichteplot (FSC: x-Achse, SSC: y-Achse). Die Lymphozytenpopulation wird mit Region 1 (R1) gekennzeichnet.
- B: Mittels Durchflusszytometrie wurde der Anteil der  $CD3^+CD4^+$  T Zellen festgelegt und als Region 2 (R2) definiert.
- C: Der Anteil der  $CD25^+FOXP3^+$  Zellen innerhalb der  $CD3^+CD4^+$  T Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt und ist im rechten oberen Quadranten zu sehen.

Den prozentualen Anteil  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  T Zellen in PBMCs von gesunden Probanden und JIA Patienten mit MTX Behandlung zeigt Abbildung 7.



**Abb. 7. Prozentualer Anteil  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  T Zellen in PBMCs von gesunden Probanden und JIA Patienten mit MTX Behandlung**

Die Abbildung zeigt mit einem Scatter Plot den prozentualen Anteil  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  T Zellen in Lymphozyten von gesunden Spendern sowie Patienten mit JIA, die mit MTX behandelt wurden. Der prozentuale Anteil  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  wurde durch Beschränkung auf die  $CD4^+$  T Zellsubpopulation bestimmt. Die horizontalen Linien repräsentieren den arithmetischen Mittelwert, die vertikalen Linien den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Signifikanzanalysen wurden mithilfe des Student's *t*-Test für gepaarte Stichproben durchgeführt.

Wie in Abbildung 7 ersichtlich, war bei JIA Patienten, die mit MTX alleine behandelt wurden, kein signifikant höherer Anteil an  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  T Zellen (Mittelwert  $\pm$  SEM;  $1.01 \pm 0.13$  %), verglichen mit PBMCs gesunder Probanden ( $1.07 \pm 0.17$  %) zu vermerken.

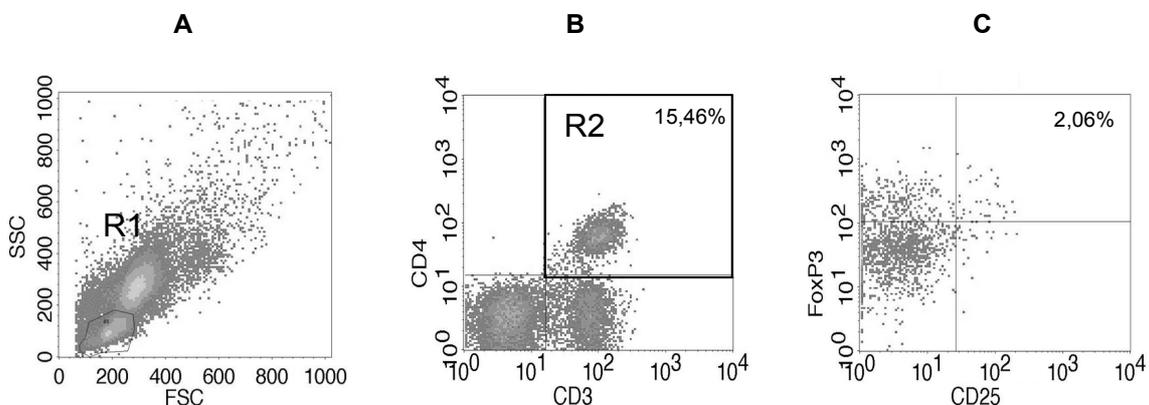
### 3.1.4 Einfluss von Methotrexat und Etanercept *in vivo*

Des Weiteren wurde ermittelt, ob die Behandlung mit MTX in Kombination mit Etanercept den Anteil von  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  regulatorischen T Zellen in den Lymphozyten bei JIA Patienten erhöht.

Grundlage dieser Untersuchung waren eigene Ergebnisse und Studien, die eine Erhöhung der regulatorischen T Zellen durch TNF- $\alpha$ -Blockade bei Patienten mit rheumatoider Arthritis zeigten [116]. Diese Ergebnisse werden jedoch kontrovers diskutiert [117].

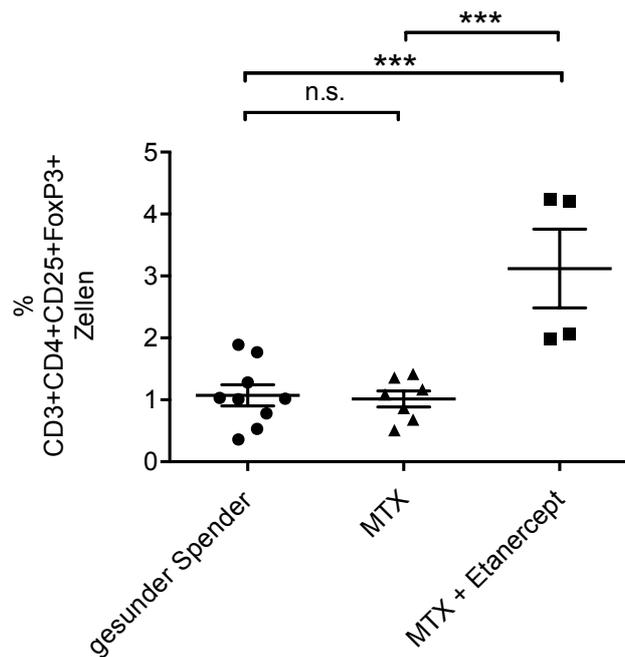
Um den Anteil an CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatorischen T Zellen von JIA Patienten mit MTX und Etanercept Behandlung zu bestimmen, wurden PBMCs aus dem Peripherblut von JIA Patienten, die mit MTX und Etanercept (n=4) behandelt wurden, PBMCs von JIA Patienten mit MTX Behandlung (n=7) und gesunden Probanden (n=9) isoliert (s. 2.2.3) und der Anteil an regulatorischen T Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

Die phänotypische Analyse der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatorischen T Zellen eines JIA Patienten, der mit MTX und Etanercept behandelt wurde, zeigt exemplarisch Abbildung 8, den prozentualen Anteil CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T Zellen in PBMCs gesunder Probanden, in PBMCs von JIA Patienten mit MTX Behandlung und JIA Patienten mit MTX und Etanercept Behandlung Abbildung 9.



**Abb. 8. Phänotypische Analyse der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatorischen T Zellen eines JIA Patienten, der mit MTX und Etanercept behandelt wurde**

- A: FSC/SSC Dichteplot (FSC: x-Achse, SSC: y-Achse). Die Lymphozytenpopulation wird durch Region 1 (R1) definiert.
- B: Der Anteil der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt und wird als Region 2 (R2) definiert.
- C: Innerhalb der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T Zellen wurde der Anteil der CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Zellen durchflusszytometrisch festgelegt und ist im rechten oberen Quadranten ersichtlich.



**Abb. 9. Prozentualer Anteil  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  T Zellen in PBMCs von gesunden Spendern, JIA Patienten mit MTX Behandlung und JIA Patienten mit MTX + Etanercept Behandlung**

Dargestellt ist ein Scatter Plot, der den prozentualen Anteil an  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  Zellen in Lymphozyten von gesunden Spendern sowie Patienten mit JIA behandelt mit MTX bzw MTX + Etanercept nach durchflusszytometrischer Analyse zeigt. Der prozentuale Anteil  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  wurde durch Beschränkung auf die  $CD4^+$  T Zellsubpopulation analysiert. Die horizontalen Linien repräsentieren den arithmetischen Mittelwert, die vertikalen Linien den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Statistische Signifikanz wurde mittels One-way ANOVA mit Bonferroni's post-hoc test ermittelt,  $***P < 0.001$ .

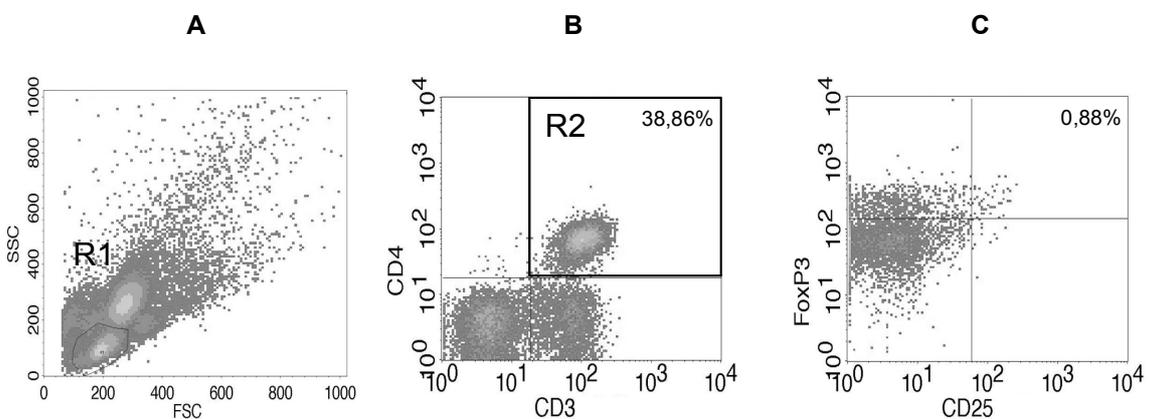
Es konnte gezeigt werden, dass JIA Patienten, die mit MTX in Kombination mit Etanercept behandelt wurden, einen signifikant höheren Anteil an  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  T Zellen (Mittelwert  $\pm$  SEM;  $3.12 \pm 0.64$  %) verglichen mit PBMCs von JIA Patienten, die nur mit MTX behandelt wurden ( $1.01 \pm 0.13$  %) bzw. verglichen mit PBMCs gesunder Spender ( $1.07 \pm 0.17$  %) aufwiesen.

### 3.1.5 Einfluss von Methotrexat und Adalimumab in vivo

Weiterhin wurde der Einfluss auf die Entwicklung von regulatorischen T Zellen bei JIA Patienten mit Behandlung durch MTX in Kombination mit Adalimumab untersucht.

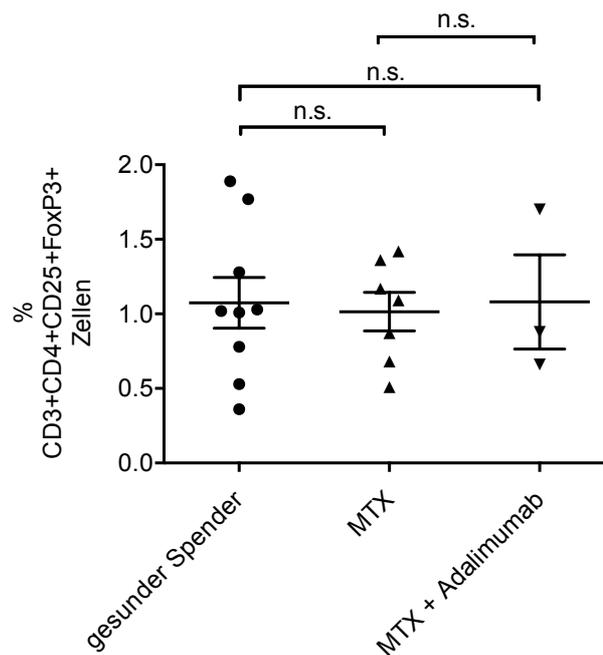
PBMCs aus dem Peripherblut von gesunden Probanden (n=9), PBMCs von JIA Patienten mit MTX Behandlung (n=7) und PBMCs von JIA Patienten mit MTX und Adalimumab Behandlung (n=3) wurden isoliert, mit CD4, CD25, FOXP3 Antikörpern markiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert (s. 2.2.1 und 2.2.3).

Abbildung 10 zeigt exemplarisch die phänotypische Analyse der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatorischen T Zellen eines JIA Patienten mit MTX und Adalimumab Behandlung und Abbildung 11 den prozentualen Anteil an CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T Zellen in PBMCs von gesunden Probanden, JIA Patienten mit MTX Behandlung und JIA Patienten mit MTX und Adalimumab Behandlung.



**Abb. 10 Phänotypische Analyse der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatorischen T Zellen eines JIA Patienten, der mit MTX und Adalimumab behandelt wurde**

- A: FSC/SSC Dichteplot (FSC: x-Achse, SSC: y-Achse). Die Lympozytenpopulation wird durch Region 1 (R1) definiert.
- B: Als Region 2 (R2) wurde der Anteil der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T Zellen nach durchflusszytometrischer Analyse festgelegt.
- C: Der Anteil der CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt und befindet sich im rechten oberen Quadranten.



**Abb. 11** Prozentualer Anteil  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  T Zellen in PBMCs von gesunden Probanden, JIA Patienten mit MTX Behandlung und JIA Patienten mit MTX und Adalimumab Behandlung

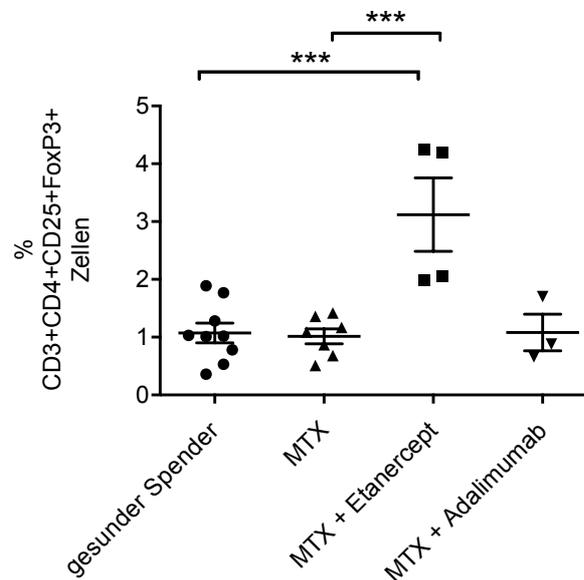
In der Abbildung ist mit einem Scatter Plot der prozentuale Anteil  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  T Zellen in Lymphozyten von gesunden Spendern (n=9) sowie Patienten mit JIA, die mit MTX (n=7) bzw. MTX + Adalimumab (n=3) behandelt wurden, dargestellt. Durch Beschränkung auf die  $CD4^+$  T Zellsubpopulation wurde der prozentuale Anteil  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  T Zellen bestimmt.

Die horizontalen Linien repräsentieren den arithmetischen Mittelwert, die vertikalen Linien den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Signifikanzanalysen wurden mittels One-way ANOVA mit Bonferroni's post-hoc test ermittelt.

Zusammenfassend wurde bei JIA Patienten, die mit MTX und Adalimumab behandelt wurden, kein signifikant höherer Anteil an  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  T Zellen (Mittelwert  $\pm$  SEM;  $1.08 \pm 0.32$  %) verglichen mit PBMCs von JIA Patienten, die mit MTX alleine behandelt wurden, ( $1.01 \pm 0.13$  %) bzw. verglichen mit PBMCs gesunder Spender ( $1.07 \pm 0.17$  %) detektiert.

### 3.1.6 Vergleich von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatorischen Zellen bei unterschiedlichen immunsuppressiven Therapieformen bei JIA

Fasst man die oben dargestellten Ergebnisse in einer Abbildung zusammen, wird deutlich, dass bei JIA Patienten, die mit MTX und Etanercept (n=4) behandelt wurden, signifikant mehr regulatorische T Zellen im peripheren Blut nachgewiesen werden konnten als bei gesunden Spendern (n=9), JIA Patienten, die nur mit MTX (n=7) oder einer Kombination von MTX und Adalimumab (n=3), therapiert wurden.



**Abb. 12 Prozentualer Anteil CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T Zellen bei verschiedenen Behandlungen**

Mononukleäre Zellen aus dem Blut gesunder Spender sowie JIA Patienten mit den in Tabelle 1 beschriebenen Charakteristika wurden mithilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Der prozentuale Anteil CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T Zellen in den Lymphozyten ist graphisch dargestellt. Die horizontalen Linien repräsentieren den arithmetischen Mittelwert, die vertikalen Linien den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Statistische Signifikanz wurde mittels One-way ANOVA mit Bonferroni's post-hoc test ermittelt, \*\*\* $P < 0.001$ .

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der Anteil an CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatorischen T Zellen durch Behandlung mit MTX in Kombination mit Etanercept signifikant zunimmt.

### 3.2 Nachweis von IL-17 und IFN- $\gamma$ produzierenden T Zellen *ex vivo*

Es ist bekannt, dass die Anwesenheit des Zytokins TGF- $\beta$  mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-6, IL-23 und IL-21 die Transkriptionsfaktoren STAT 3 und ROR $\gamma$ T aktivieren, wodurch T Zellen zu T Helfer Zellen vom Th17-Typ differenzieren. Th17 Zellen produzieren die Zytokine IL-17, IL-23, IL-22, welche inflammatorische und gewebeschädigende Effekte vor allem in den Gelenken ausüben [107, 108].

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-12 zur Differenzierung einer naiven T Zelle zur Th1 Zelle beitragen. Th1 Zellen schütten die Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$  aus und wirken dadurch proinflammatorisch [69]. Besonders TNF- $\alpha$  dient als Angriffsort von Biologika wie Etanercept und Adalimumab (siehe 1.1.5.2).

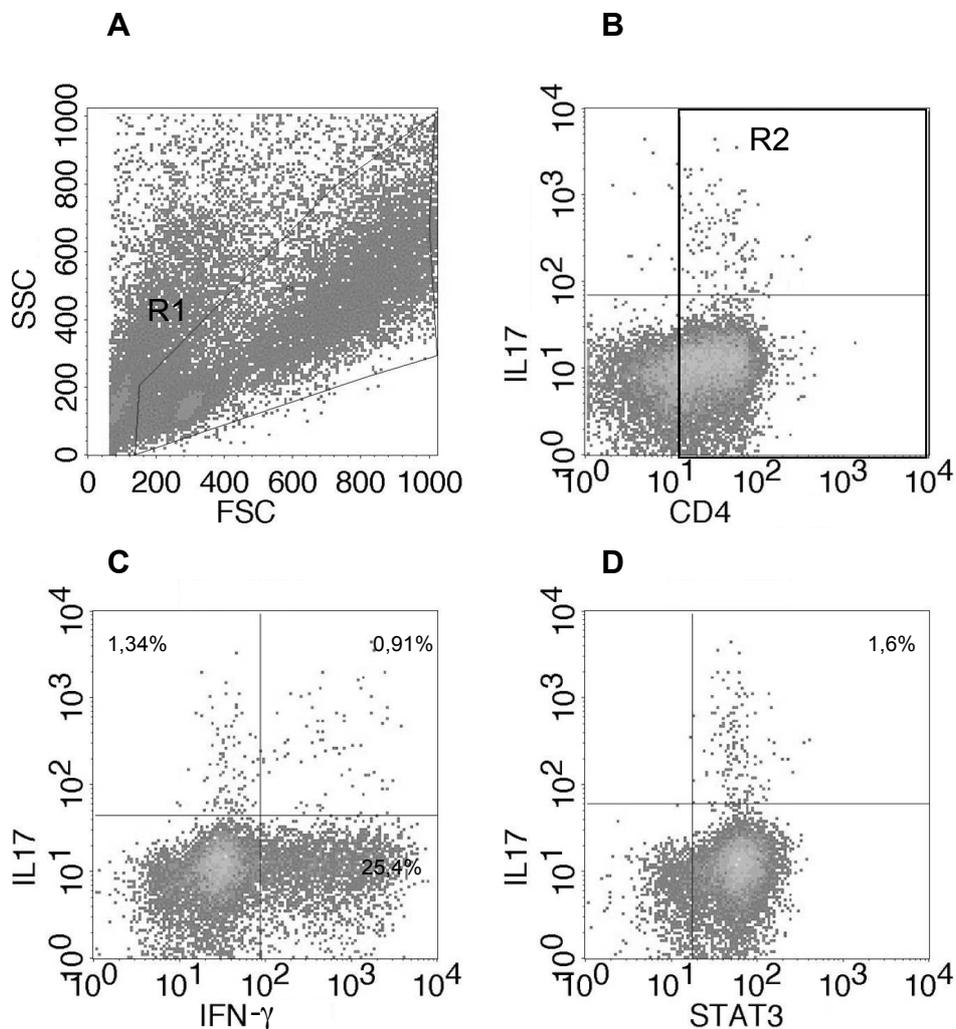
Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss die unterschiedlichen immunsuppressiven Behandlungen auf den Anteil an induzierten IL-17<sup>+</sup> sowie IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen in den PBMCs haben.

Zur Analyse IL-17 und IFN- $\gamma$  produzierender T Zellen wurden PBMCs aus dem Peripherblut von gesunden Spendern mit löslichem  $\alpha$ CD3 Antikörper (100 ng/ml) kokultiviert und nach fünf Tagen mit PMA und Ionomycin restimuliert. Mithilfe der Durchflusszytometrie wurden die IL-17<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> sowie Stat3<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD4<sup>+</sup> T Zellpopulation bestimmt. Abbildung 9 zeigt exemplarisch die phänotypische Analyse der IL-17 und IFN- $\gamma$  produzierenden T Zellen eines gesunden Spenders.

Mithilfe des nachfolgenden Dichteplots wurde der Anteil an CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> T Zellen innerhalb der Lymphozyten bestimmt (Abb. 13B). Diese CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> T Zellen wurden in Region 2 (R2) definiert. Anschließend wurde der Anteil an 1. IL-17<sup>+</sup> Th17 Zellen, 2. IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Th1 Zellen und 3. IL-17<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Th17/Th1 Zellen (Abb. 13C), 4. IL-17<sup>+</sup>/Stat3<sup>+</sup> zur genaueren Abgrenzung der Th17 Zellen (Abb. 13D) bestimmt.

In den nachfolgenden Abbildungen ist der prozentuale Anteil der IL-17<sup>+</sup> Th17 Zellen im linken oberen Quadranten, der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Th1 Zellen im rechten unteren Quadranten, der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> Th1/Th17 Zellen im rechten oberen Quadranten (Abb. 13C) und der IL-17<sup>+</sup>/Stat3<sup>+</sup> Th17 Zellen im rechten oberen Quadranten (Abb. 13D) abzulesen.

Der durchschnittlich ermittelte Anteil an IL-17<sup>+</sup> Th17 Zellen bei den gesunden Spendern (n=18) betrug 2.83 % (Abb. 13C), an IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Th1 Zellen (n=18) 16.03 % (Abb. 13C), an IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> Th1/Th17 Zellen (n=17) 1.69 % (Abb. 13C) und an IL-17<sup>+</sup>/Stat3<sup>+</sup> Th17 Zellen (n=17) 3.08 % (Abb. 13D).



**Abb. 13** Phänotypische Analyse der IL-17 und IFN- $\gamma$  produzierenden T Zellen eines gesunden Spenders nach Kokultivierung mit löslichem  $\alpha$ CD3 Antikörper und Restimulation nach fünf Tagen

- A: FSC/SSC Dichteplot (FSC: x-Achse, SSC: y-Achse). Region 1 (R1) definiert die Lymphozytenpopulation.
- B: Der Anteil der CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> T Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt und als Region 2 (R2) definiert.
- C: Der Anteil der IL-17<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> T Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt und befindet sich im linken oberen Quadranten, der Anteil der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T Zellen im rechten unteren Quadranten und der Anteil der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> T Zellen im rechten oberen Quadranten.
- D: Der Anteil der IL-17<sup>+</sup> Stat3<sup>+</sup> T Zellen innerhalb der CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> T Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt und befindet sich im rechten oberen Quadranten.

Die Studie schloss Patienten mit JIA ein, die mit MTX alleine, in Kombination mit Etanercept oder Adalimumab oder mit einem TNF- $\alpha$  Inhibitor alleine behandelt wurden. Die Patienten wurden nach Einwilligung (informed consent) in die Studie eingeschlossen. In Tabelle 3 sind die Charakteristika der Patienten dargestellt.

Der Stichprobenumfang von Patienten, die mit einem TNF- $\alpha$  Inhibitor alleine behandelt wurden, ist zu gering, um in die Auswertung miteinbezogen werden zu können.

**Tab. 3 Charakteristika der Patienten in der Studie**

ANA = anti-nukleärer Antikörper; MTX = Methotrexat; NSAR = nicht steroidale Antirheumatika

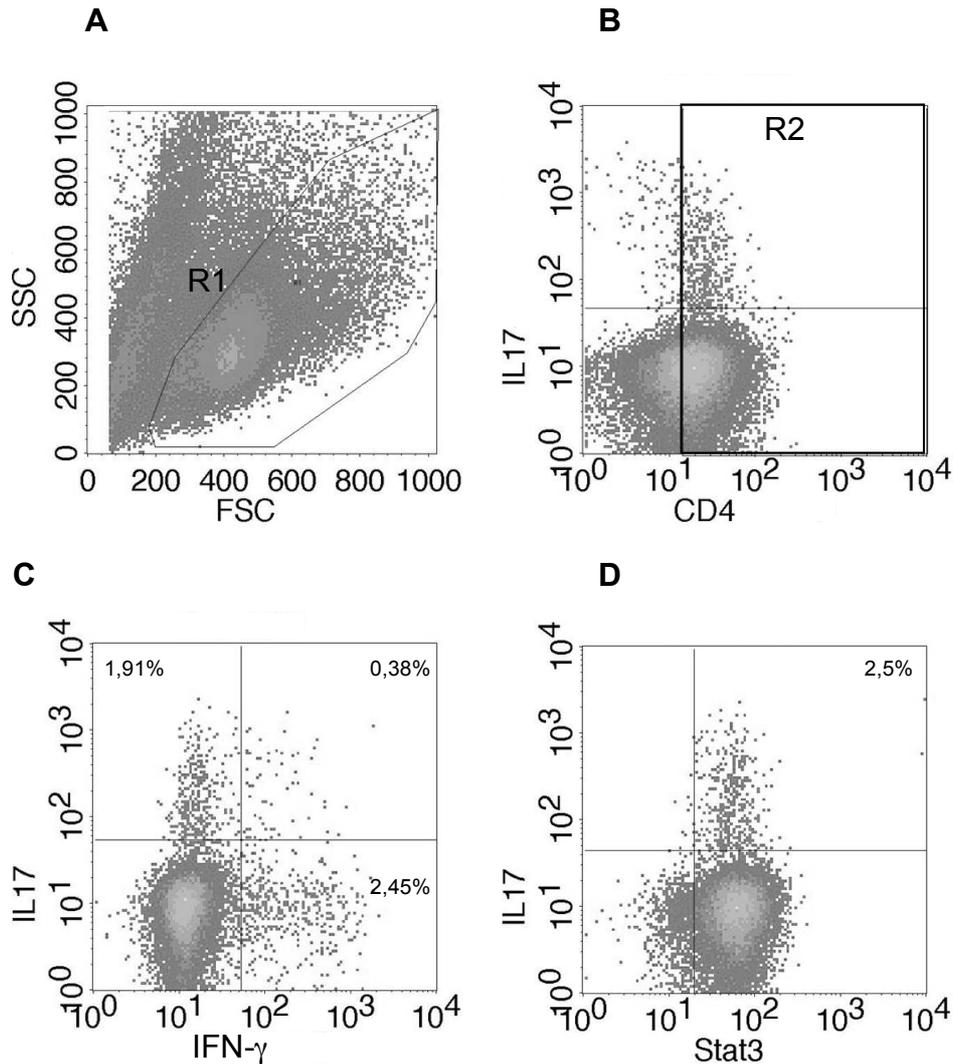
	Persistent oligoartikulär	Extended oligoartikulär	Polyartikulär (seronegativ/ seropositiv)	JIA, andere
<b>Charakteristika Patienten mit MTX- Behandlung</b>				
Anzahl (Gesamtpatientenzahl=6)	1 (16.7 %)	1 (16.7 %)	2 (33.3 %) (seronegativ)	2 (33.3 %)
weiblich : männlich	1:0	1:0	2:0	2:0
Mittleres Alter in Jahren (± SEM)	15	12	11,5	10
Anzahl (%) ANA+	-	1 (100 %)	-	1 (50 %)
Anzahl (%) zusätzliche Behandlung mit NSAR	-	1 (100 %)	2 (100 %)	1 (50 %)
<b>Charakteristika Patienten mit MTX+Etanercept-Behandlung</b>				
Anzahl (Gesamtpatientenzahl=7)	3 (42.8 %)	1 (14.3 %)	1 (14.3%) (seronegativ)	2 (28.6 %)
weiblich : männlich	1:2	1:0	0:1	2:0
Mittleres Alter in Jahren (± SEM)	6	9	11	19
Anzahl (%) ANA+	2 (66.6 %)	-	-	unbekannt
Anzahl (%) zusätzliche Behandlung mit NSAR	1 (33.3 %)	-	-	1 (50 %)
<b>Charakteristika Patienten mit MTX+Adalimumab - Behandlung</b>				
Anzahl (Gesamtpatientenzahl=2)	1 (50 %)	-	1 (50 %) (seronegativ)	
weiblich : männlich	1:0	-	1:0	
Mittleres Alter in Jahren (± SEM)	11	-	20	
Anzahl (%) ANA+	1 (100 %)	-	-	
Anzahl (%) zusätzliche Behandlung mit NSAR	-	-	-	

### 3.2.1 Einfluss von Methotrexat in vivo

Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, wie sich das Verhältnis von IL-17 sezernierender Th17 Zellen und IFN- $\gamma$  freisetzender Th1 Zellen bei JIA Patienten unter MTX Behandlung verändert.

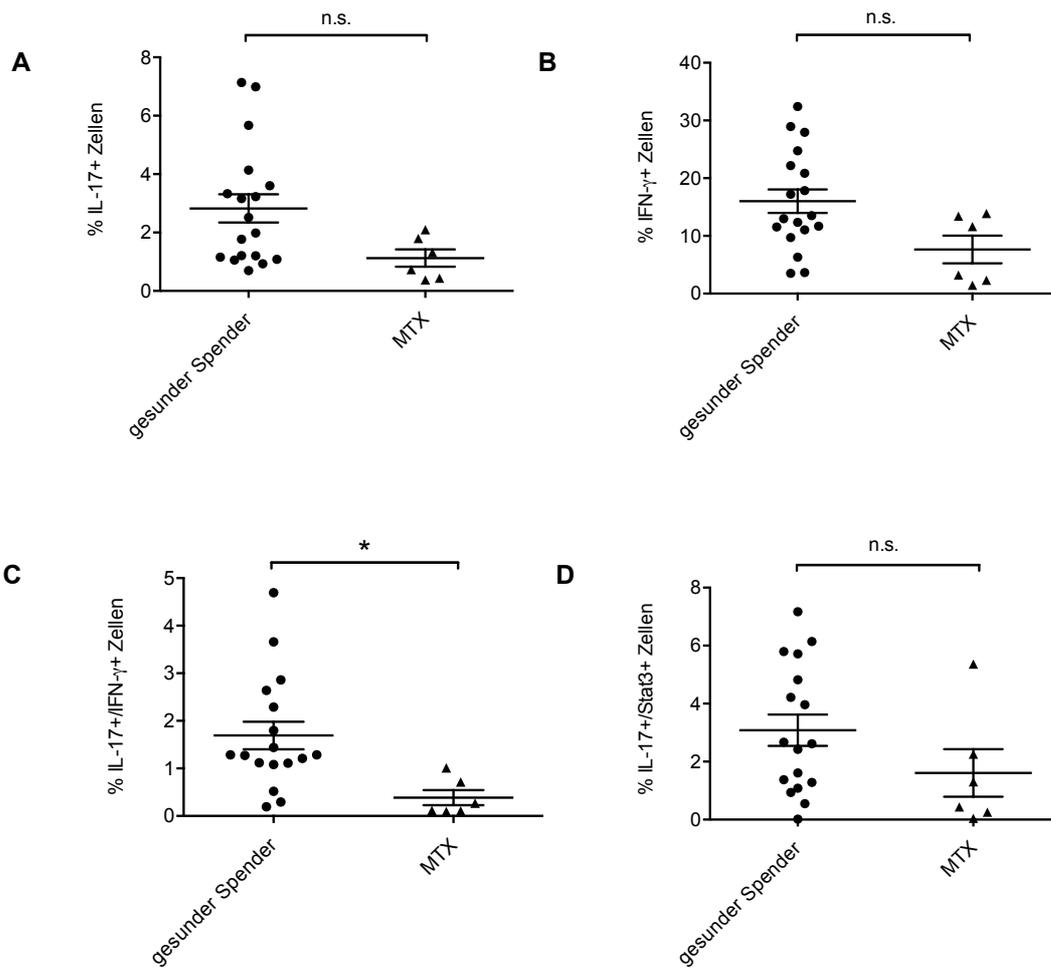
Zuerst wurden die T Zellen enthaltenden PBMCs gesunder Donoren (A, B n=18; C, D n=17) und von Patienten, die mit MTX behandelt wurden (n=6) durch die Kokultivierung mit einem löslichen  $\alpha$ CD3 Antikörper (100 ng/ml) stimuliert. Nach fünf Tagen erfolgte eine Restimulation der Zellen mit PMA/Ionomycin. Daraufhin wurde der Anteil an IL-17<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> sowie Stat3<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD4<sup>+</sup> T Zellpopulation durchflusszytometrisch bestimmt.

Die phänotypische Analyse der IL-17 und IFN- $\gamma$  produzierenden T Zellen eines JIA Patienten mit MTX Behandlung wird exemplarisch in Abbildung 14 dargestellt. In Abbildung 12 wird der prozentuale Anteil der IL-17<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, IL-17<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, IL-17<sup>+</sup>/Stat3<sup>+</sup> T Zellen gezeigt.



**Abb. 14 Phänotypische Analyse der IL-17 und IFN- $\gamma$  produzierenden T Zellen eines JIA Patienten mit MTX Behandlung nach Kokultivierung mit löslichem  $\alpha$ CD3 Antikörper und Restimulation nach fünf Tagen**

- A: FSC/SSC Dichteplot (FSC: x-Achse, SSC: y-Achse). Region 1 (R1) definiert die Lymphozytenpopulation.
- B: Der Anteil der CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> T Zellen wurde durchflusszytometrisch analysiert und als Region 2 (R2) festgelegt.
- C: Der Anteil der IL-17<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> T Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt und ist im linken oberen Quadranten erkennbar, der Anteil der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T Zellen im rechten unteren Quadranten und der Anteil der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> T Zellen im rechten oberen Quadranten.
- D: Der Anteil der IL-17<sup>+</sup> Stat3<sup>+</sup> T Zellen innerhalb der CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> T Zellen wurde durchflusszytometrisch analysiert und befindet sich im rechten oberen Quadranten.



**Abb. 15** Prozentualer Anteil IL-17<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, IL-17<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>/Stat3<sup>+</sup> T Zellen in PBMCs gesunder Probanden und PBMCs von JIA Patienten mit MTX Behandlung

Der prozentuale Anteil an (A) IL-17<sup>+</sup> Zellen (B) IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen (C) IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> Zellen (D) IL-17<sup>+</sup>/Stat3<sup>+</sup> Zellen wurde durchflusszytometrisch in PBMCs von Patienten mit JIA mit MTX Behandlung sowie in PBMCs von gesunden Spendern bestimmt.

Die horizontalen Linien repräsentieren den arithmetischen Mittelwert, die vertikalen Linien den SEM. Signifikanzanalysen wurden mithilfe des Student's t-Test für gepaarte Stichproben durchgeführt, \*P<0.05.

Es konnte gezeigt werden, dass bei JIA Patienten, die mit MTX behandelt wurden, kein signifikant unterschiedlicher Anteil an Th17 Zellen (Mittelwert  $\pm$  SEM;  $1.13 \pm 0.30$  %) induziert wurde verglichen mit PBMCs gesunder Spender ( $2.83 \pm 0.48$  %) (Abb. 15A).

Des Weiteren wiesen JIA Patienten, die mit MTX behandelt wurden, einen signifikant niedrigeren Anteil an IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Th1 Zellen (Mittelwert  $\pm$  SEM;  $7.65 \pm$

2.41 %) verglichen mit PBMCs gesunder Spender ( $16.03 \pm 2.03$  %) auf (Abb. 15B).

Außerdem wurde bei JIA Patienten, die mit MTX behandelt wurden, ein signifikant niedrigerer Anteil an IL-17<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Th17/Th1 Zellen (Mittelwert  $\pm$  SEM;  $0.39 \pm 0.16$  %) verglichen mit PBMCs gesunder Spender ( $1.69 \pm 0.29$  %) deutlich (Abb. 15C).

Darüber hinaus, zeigten JIA Patienten mit MTX Behandlung keinen signifikant geringeren Anteil an IL-17<sup>+</sup>/Stat3<sup>+</sup> Th17 Zellen (Mittelwert  $\pm$  SEM;  $1.61 \pm 0.82$  %) im Vergleich mit PBMCs gesunder Spender ( $3.08 \pm 0.54$  %) (Abb. 15D).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass JIA Patienten mit MTX Behandlung einen geringeren Anteil an IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Th1 Zellen und IL-17<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Th17/Th1 Zellen besitzen.

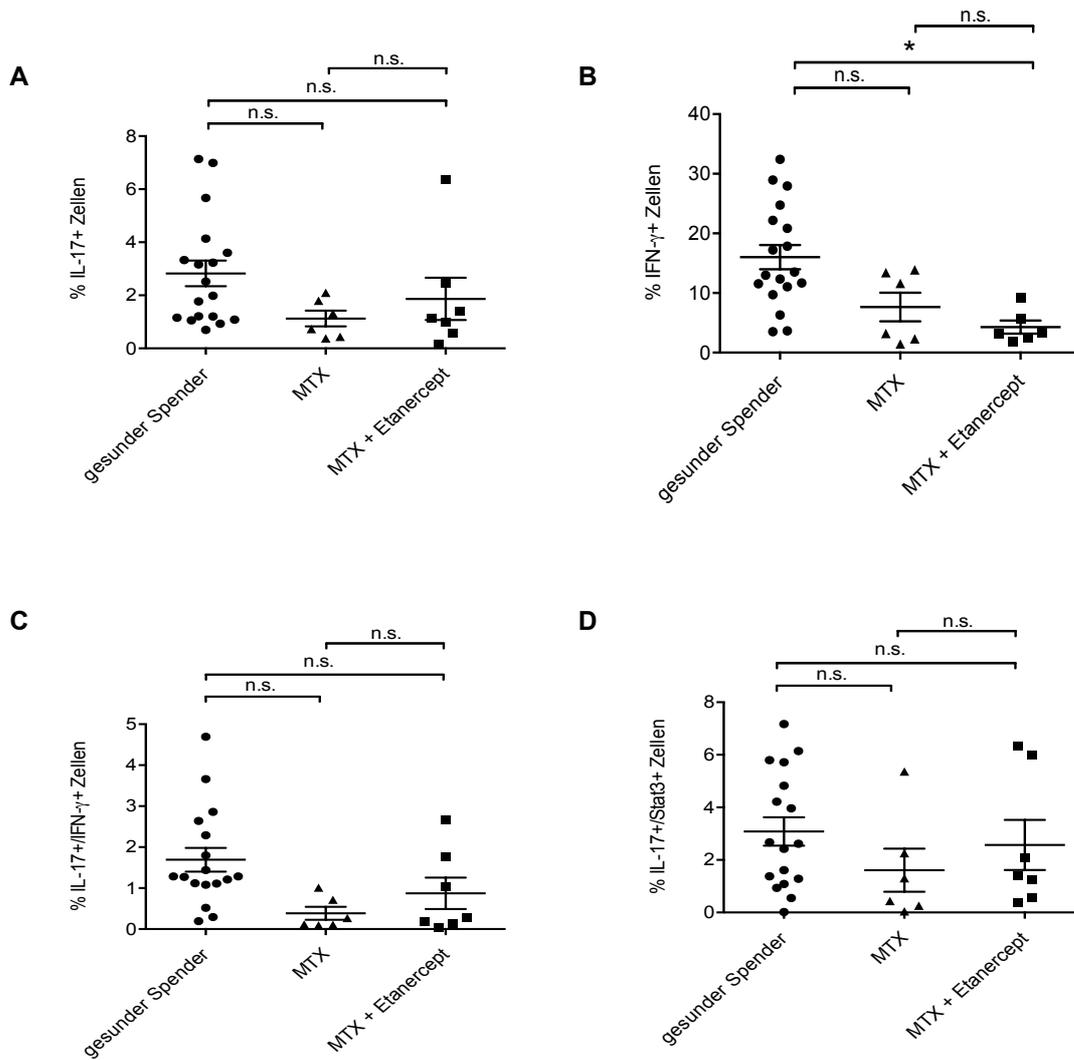
### **3.2.2 Einfluss von Methotrexat in Kombination mit Etanercept in vivo**

Außerdem wurde in diesem Projekt untersucht, welchen Einfluss die Behandlung mit MTX in Kombination mit Etanercept auf die IL-17 und IFN- $\gamma$  produzierenden T Zellen von JIA Patienten hat.

Dafür wurden zunächst PBMCs gesunder Spender (A, B n=18; C, D n=17) und PBMCs von JIA Patienten, die mit MTX in Kombination mit Etanercept behandelt wurden (A, B n=6; C, D n=7) mit einem löslichen  $\alpha$ CD3 Antikörper (100 ng/ml) stimuliert. Nach fünf Tagen wurden die PBMCs erneut mit PMA/Ionomycin stimuliert und die CD4<sup>+</sup> Zellen aufgereinigt. Danach erfolgte die Bestimmung des Anteils an IL-17<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> sowie Stat3<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD4<sup>+</sup> T Zellpopulation mittels Durchflusszytometrie.

Die phänotypische Analyse und Auswertung der JIA Patienten mit MTX und Etanercept Behandlung erfolgte analog zu Abbildung 10.

Der prozentuale Anteil der IL-17<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, IL-17<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>/Stat3<sup>+</sup> T Zellen in PBMCs von gesunden Spendern, JIA Patienten mit MTX Behandlung und JIA Patienten mit MTX in Kombination mit Etanercept Behandlung in Abbildung 16.



**Abb. 16** Prozentualer Anteil IL-17<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, IL-17<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>/Stat3<sup>+</sup> T Zellen in PBMCs von gesunden Spendern, JIA Patienten mit MTX Behandlung und JIA Patienten mit MTX + Etanercept Behandlung

Der prozentuale Anteil an (A) IL-17<sup>+</sup> Zellen (B) IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen (C) IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> Zellen (D) IL-17<sup>+</sup>/Stat3<sup>+</sup> Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie in PBMCs von Patienten mit JIA mit MTX Behandlung, in PBMCs von Patienten mit MTX + Etanercept Behandlung sowie in PBMCs von gesunden Spendern bestimmt.

Der Anteil Th17<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, IL-17<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>/Stat3<sup>+</sup> T Zellen wurde innerhalb der CD4<sup>+</sup> T Zellpopulation ermittelt. Die horizontalen Linien repräsentieren den arithmetischen Mittelwert, die vertikalen Linien den SEM.

Statistische Signifikanz wurde bei einem Umfang von zwei Gruppen (siehe Abb. 15) mittels Student's t-Test für gepaarte Stichproben ermittelt, \* $P < 0.05$ . Bei einem Umfang von mehr als zwei Gruppen (siehe Abb. 16) wurden Signifikanzanalysen mithilfe des One-way ANOVA mit Bonferroni's post-hoc test durchgeführt, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

Bei JIA Patienten, die mit MTX und Etanercept behandelt wurden, konnte gezeigt werden, dass kein signifikant unterschiedlicher Anteil an Th17 Zellen (Mittelwert  $\pm$  SEM;  $1.11 \pm 0.32$  %) (Abb. 13A), an IL-17<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Th17/Th1 Zellen ( $0.87 \pm 0.38$  %) (Abb. 16C) und IL-17<sup>+</sup>/Stat3<sup>+</sup> Th17/Th1 Zellen ( $2.57 \pm 0.95$  %) (Abb. 16D) induziert wurde verglichen mit PBMCs gesunder Spender.

Allerdings haben JIA Patienten mit MTX + Etanercept Behandlung einen signifikant niedrigeren Anteil an IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Th1 Zellen ( $4.29 \pm 1.11$  %) (Abb. 16B) im Vergleich mit PBMCs gesunder Spender ( $16.03 \pm 2.03$  %).

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass bei JIA Patienten, die mit MTX in Kombination mit Etanercept behandelt wurden, der Anteil an IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Th1 Zellen in den PBMCs verringert ist.

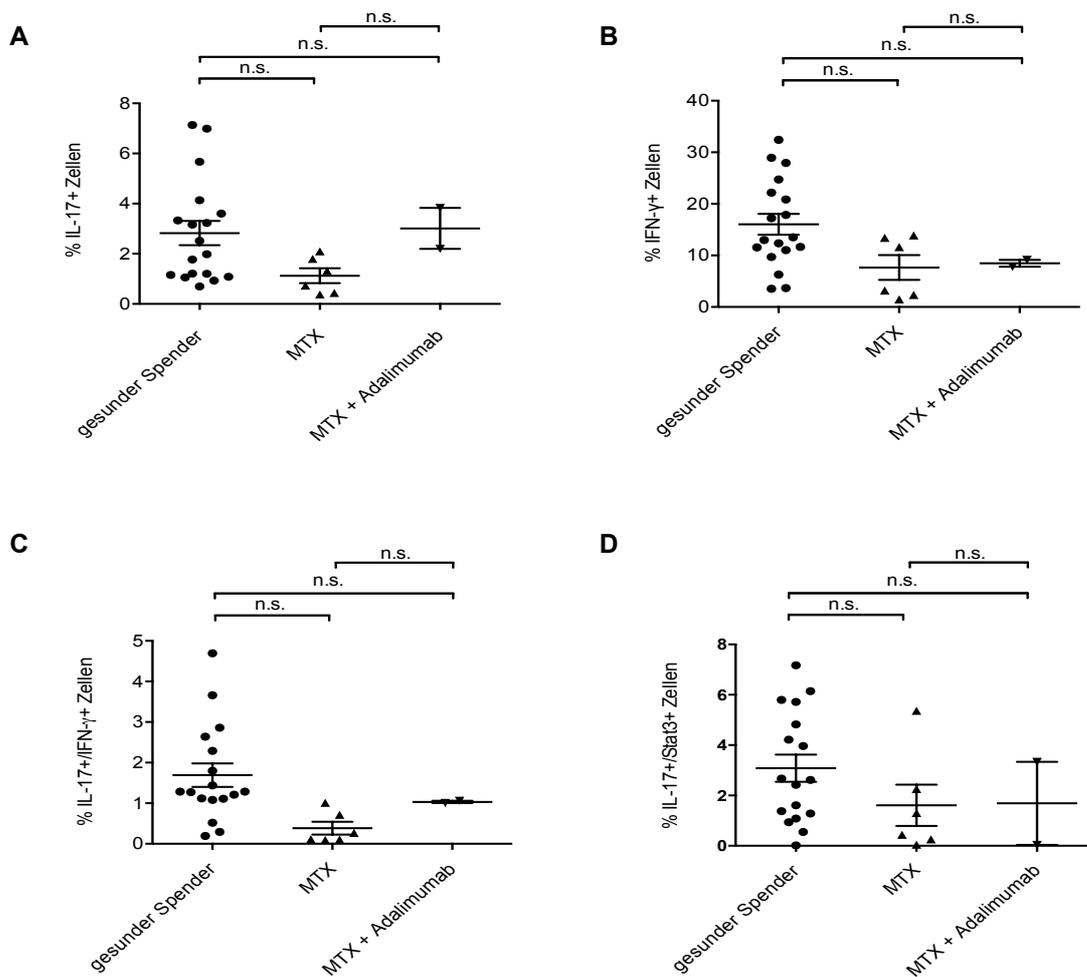
### **3.2.3 Einfluss von Methotrexat in Kombination mit Adalimumab *in vivo***

Des Weiteren wurde die Wirkung von MTX in Kombination mit Adalimumab auf die IL-17 bzw. IFN- $\gamma$  sezernierenden Th17- und Th1 Zellen im Blut von JIA Patienten, die mit MTX und Adalimumab behandelt wurden, untersucht.

Hierzu erfolgte die Kokultivierung von PBMCs von JIA Patienten, die mit MTX in Kombination mit Adalimumab behandelt wurden (n=2) und PBMCs gesunder Probanden (A, B n=18; C, D n=17) mit löslichem  $\alpha$ CD3 Antikörper (100 ng/ml). Anschließend wurden die Zellen nach fünf Tagen mit PMA/Ionomycin restimuliert und für die Expression von IL-17 und IFN- $\gamma$  und Stat3 gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt.

Die Auswertung und phänotypische Analyse der IL-17 und IN IFN- $\gamma$  sezernierenden T Zellen der JIA Patienten mit MTX und Adalimumab Behandlung wurde analog zu Abbildung 10 durchgeführt.

Abbildung 14 zeigt den prozentualen Anteil der IL-17<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, IL-17<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>/Stat3<sup>+</sup> T Zellen in PBMCs von gesunden Spendern, JIA Patienten mit MTX Behandlung und JIA Patienten mit MTX in Kombination mit Adalimumab Behandlung.



**Abb. 17** Prozentualer Anteil IL-17<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, IL-17<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>/Stat3<sup>+</sup> T Zellen in PBMCs von gesunden Spendern, JIA Patienten mit MTX Behandlung und JIA Patienten mit MTX + Adalimumab Behandlung

Der prozentuale Anteil an (A) IL-17<sup>+</sup> Zellen (B) IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen (C) IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> (D) IL-17<sup>+</sup>/Stat3<sup>+</sup> wurde durchflusszytometrisch in PBMCs von JIA Patienten mit MTX + Adalimumab Behandlung, in PBMCs von Patienten mit MTX Behandlung, und in PBMCs von gesunden Spendern bestimmt.

Die Bestimmung des prozentualen Anteils der IL-17<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, IL-17<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>/Stat3<sup>+</sup> T Zellen erfolgte durch Eingrenzung auf die CD4<sup>+</sup> T Zellfraktion und wird graphisch gezeigt. Die horizontalen Linien repräsentieren den arithmetischen Mittelwert, die vertikalen Linien den SEM.

Statistische Signifikanz wurde mittels One-way ANOVA mit Bonferroni's post-hoc test ermittelt.

Es konnte gezeigt werden, dass bei JIA Patienten, die mit MTX + Adalimumab behandelt wurden, kein signifikant unterschiedlicher Anteil an Th17 Zellen (Mittelwert  $\pm$  SEM;  $3.01 \pm 0.82$  %) (Abb. 17A), IFN- $\gamma^+$  Th1 Zellen ( $8.47 \pm 0.67$  %) (Abb. 17B), IL-17 $^+$ /IFN- $\gamma^+$  Th17/Th1 Zellen ( $1.03 \pm 0.03$  %) (Abb. 17C) und IL-17 $^+$ /Stat3 $^+$  Th17/Th1 Zellen ( $1.69 \pm 1.65$  %) (Abb. 17D) induziert wurde verglichen mit PBMCs gesunder Spender.

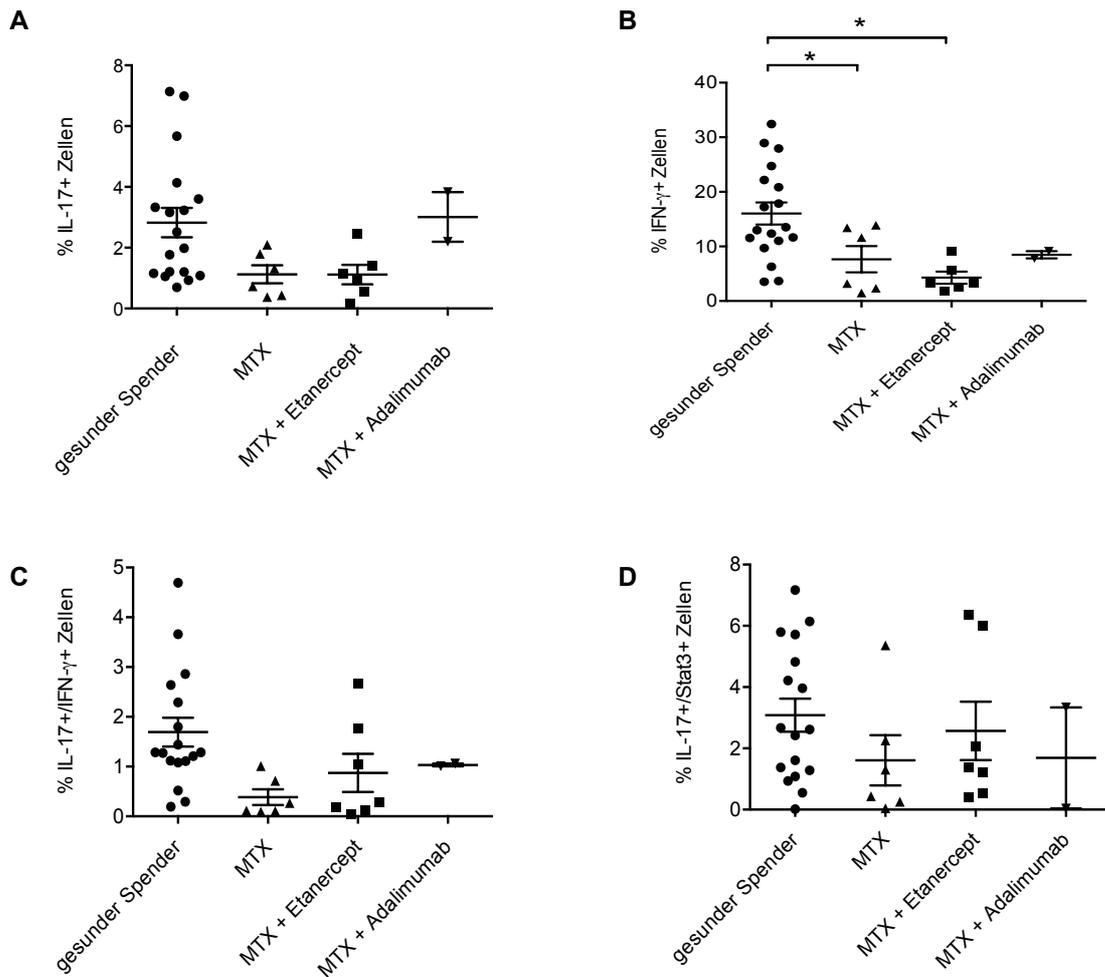
Zusammenfassend konnten keine signifikant aussagekräftigen Veränderungen hinsichtlich der Th1 und Th17 Zellen bei JIA Patienten mit MTX und Adalimumab Behandlung gefunden werden.

### **3.2.4 Vergleich Th17 und Th1 Zellen bei unterschiedlichen Therapien**

Das Ziel der Studie war es, herauszufinden, welchen Einfluss unterschiedliche Therapien auf IL-17 sezernierende Th17 Zellen und IFN- $\gamma$  produzierende Th1 Zellen haben.

Dafür wurden periphere mononukleäre Zellen von gesunden Spendern und Patienten mit JIA, die mit MTX alleine bzw. in Kombination mit Etanercept oder Adalimumab behandelt wurden, untersucht. PBMCs von oben genannten Gruppen wurden mit löslichem  $\alpha$ CD3 Antikörper (100 ng/ml) ko-kultiviert und nach fünf Tagen mit PMA/Ionomycin restimuliert und für die Expression von IL-17, IFN- $\gamma$  und Stat3 gefärbt. Somit war die Analyse IL-17 und IFN- $\gamma$  produzierender T Zellen möglich.

Wie in Abbildung 17 gezeigt, konnten keine signifikanten Unterschiede in der Bestimmung von IL-17 $^+$  Th17 Zellen, aber eine signifikante Abnahme sowohl am Anteil von IFN- $\gamma^+$  Th1 Zellen bei JIA Patienten mit alleiniger MTX und MTX + Etanercept Behandlung als auch am Anteil von IL-17/IFN- $\gamma$  Th17/Th1 Zellen bei JIA Patienten mit MTX Behandlung gezeigt werden.



**Abb. 18** Prozentualer Anteil IL-17<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, IL-17<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>/Stat3<sup>+</sup> T Zellen bei verschiedenen Behandlungen

Der prozentuale Anteil an (A) IL-17<sup>+</sup> Zellen (B) IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen (C) IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> und (D) IL-17<sup>+</sup>/Stat3<sup>+</sup> wurde mittels Durchflusszytometrie in PBMCs von JIA Patienten mit verschiedenen Behandlungen in der CD4<sup>+</sup> T Zellsubpopulation bestimmt und ist graphisch dargestellt.

Die horizontalen Linien repräsentieren den arithmetischen Mittelwert, die vertikalen Linien den SEM. Statistische Signifikanz wurde mittels One-way ANOVA mit Bonferroni's post-hoc test ermittelt, \* $P < 0.05$ .

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass der Anteil an IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Th1 Zellen bei JIA Patienten, die mit MTX alleine und in Kombination mit Etanercept behandelt wurden, signifikant niedriger war als bei gesunden Spendern. Des Weiteren zeigte sich eine fallende Tendenz im Anteil an IL-17<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Th17/Th1

Zellen bei JIA Patienten mit MTX Behandlung, auch wenn keine Signifikanz nachzuweisen ist.

Insgesamt stellte sich trotz fehlender Signifikanz heraus, dass der Anteil an Th1 Zellen, Th17 Zellen und Th1/Th17 Zellen bei JIA Patienten mit MTX und MTX + Etanercept Behandlung tendenziell geringer ist als bei gesunden Spendern.

Die Studie, in der untersucht wurde, ob *in vivo* aktivierte Monozyten die IL-17 Sekretion von Th17 Zellen *in vitro* induzieren können, hat aufgrund nicht mehr vitaler Monozyten keine relevanten Ergebnisse gezeigt.

### **3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Es ist bekannt, dass  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  regulatorische T Zellen die Autoinflammation bei der JIA limitieren. Th17 Zellen und Th1 Zellen hingegen wirken durch Sekretion proinflammatorischer Zytokine krankheitsfördernd. Um diese Hypothesen zu überprüfen, wurde der Anteil dieser Zellen im Blut von Patienten mit JIA unter verschiedenen Therapien untersucht.

Insgesamt konnte in den *ex vivo* Untersuchungen eine Zunahme der  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  regulatorischen T Zellen durch die Behandlung mit dem TNF- $\alpha$  Inhibitor Etanercept festgestellt werden. Des Weiteren war eine Abnahme von  $IFN-\gamma^+$  Th1 Zellen durch die Behandlung mit MTX alleine und MTX in Kombination mit Etanercept zu erkennen. Darüber hinaus war ein signifikant geringerer Anteil an  $IL-17^+/IFN-\gamma^+$  TH17/Th1 Zellen bei JIA Patienten mit MTX Behandlung nachweisbar. Eine signifikante Änderung von  $IL-17^+$  produzierenden Zellen im Blut von JIA Patienten konnte allerdings unter Behandlung mit MTX oder Etanercept nicht beobachtet werden.

Insgesamt konnte aber bei den Analysen der Proben von JIA Patienten gezeigt werden, dass durch eine Behandlung mit MTX und Etanercept regulatorische Zellen erhöht werden.

Ferner konnte festgestellt werden, dass durch die Behandlung mit MTX alleine und MTX in Kombination mit Etanercept die Th1 Zellen verringert werden.

## 4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von verschiedenen immunsuppressiven Behandlungen auf T Zell Subpopulationen untersucht.

### 4.1 Klinische Interpretation von regulatorischen T Zellen und TNF- $\alpha$

#### 4.1.1 Regulatorische T Zellen bei autoimmunen Erkrankungen

In dieser Studie wurde gezeigt, dass JIA Patienten mit MTX und Etanercept Behandlung vermehrt regulatorische T Zellen im peripheren Blut aufweisen verglichen mit gesunden Spendern.

Verschiedene Studien haben belegt, dass zu wenige bzw. funktionsunfähige Tregs zur Entstehung autoimmuner Erkrankungen beitragen [118]. Aus unseren Daten kann geschlussfolgert werden, dass eine Behandlung mit Etanercept eine erhöhte Anzahl an Tregs induziert und somit die inflammatorische Immunantwort beeinflusst.

Regulatorische T Zellen besitzen die Fähigkeit, die Aktivierung und inflammatorischen Effekte autoreaktiver T Zellen, welche der Toleranzentwicklung entkommen sind, zu unterdrücken [22]. Daher wird davon ausgegangen, dass die Entstehung von Autoimmunerkrankungen auf ein Ungleichgewicht zwischen Regulatorzellen und Effektorzellen zugunsten der Effektorzellen zurückzuführen ist [119–121]. Die Folge ist eine gestörte Immunregulation wie sie bei Diabetes Mellitus Typ 1 [122], Multipler Sklerose [123, 124], Systemischem Lupus Erythematodes [125, 126], Rheumatoider Arthritis [127–129], CEDs [130–133] und Psoriasis [134, 135] der Fall ist. Gründe für die geschädigte Immuntoleranz, die zu Autoimmunkrankheiten führt, können ein zu geringer Anteil an regulatorischen T Zellen, Funktionsdefekte der Tregs sowie Effektor T Zellen, die gegenüber Tregs resistent sind, sein [136].

Die Anzahl der regulatorischen T Zellen von Patienten mit Autoimmunerkrankungen wird durch die Entwicklung, das Überleben, der

Proliferation in der Peripherie und das Homing an der Entzündungsstelle der Tregs beeinflusst. Bei der Produktion der Tregs im Thymus haben genetische Faktoren den größten Einfluss. Der Erhalt von Tregs in der Peripherie ist ein dynamischer Prozess und wird durch Umstände, welche die Induktion von Tregs in der Peripherie, deren Proliferation und Überleben beeinflussen, begünstigt [136]. Faktoren, welche die Entwicklung der Tregs im Thymus, die Proliferation in der Peripherie und das Überleben der Tregs bestimmen, haben einen Effekt auf die FOXP3 Expression [137–139]. Zu diesen Faktoren zählen CD28, TGF $\beta$  [137], dendritische Zellen [138] und Zytokine mit der Zytokin Rezeptor  $\gamma_c$  Kette  $\gamma_c$  IL-2, IL-4, IL-7, IL-15 [139].

Wenn die Funktionen von regulatorischen T Zellen gestört sind, können Autoimmunerkrankungen entstehen [136]. Zu den Regulationsmechanismen der Tregs wird die zellkontaktabhängige Suppression gezählt, welche die Zelloberflächenmoleküle CTLA4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) [140], CD39 [141], LAG3 (lymphocyte activation gene 3), Granzyme A und CD95 (FAS) benötigt. Die Bindung an CTLA4 übt einen inhibitorischen Effekt auf T Zellen aus, was zur Hemmung der Immunantwort führt. Wenn die Expression der beschriebenen Zelloberflächenmoleküle zu schwach ist, können Tregs keine zellkontaktabhängige Suppression durchführen [142]. Ein weiterer Funktionsfehler von Tregs tritt auf, wenn sie nicht mehr fähig sind, lösliche Faktoren wie TGF $\beta$ , IL-10 [143] und IL-35, die bei der Suppression eine Rolle spielen, zu produzieren. Es wird vermutet, dass genetische Faktoren diese Mechanismen beeinflussen. Des Weiteren spielt das lokale Zytokinenmilieu wie TNF- [144, 145], IL-2 [146], IL-6 [144], IL-12 [147], IL-7, IL-15 [148] und IL-21 [149] für die Funktion der Tregs eine entscheidende Rolle.

Viele Mechanismen führen dazu, dass Effektorzellen gegenüber Tregs resistent sind [150]. Studien haben gezeigt, dass CD4<sup>+</sup> Gedächtnis T Zellen und Th17 Zellen über eine zellspezifische Resistenz gegenüber einer Suppression durch Tregs verfügen [151]. Des Weiteren können die Zytokine IL-2, IL-4, IL-7 und IL-15, welche normalerweise die Treg Homöostase *in vitro* [139] unterstützen, die Proliferation von Effektor T Zellen in Anwesenheit von regulatorischen T Zellen fördern. Dies deutet darauf hin, dass das Auftreten dieser Zytokine kurzfristig

den Effektor T Zellen ermöglicht, der Treg vermittelten Suppression zu entgehen [136]. Darüber hinaus sind mehrere Vertreter aus der TNF-Rezeptorfamilie an der Resistenz gegenüber einer Suppression beteiligt: OX40, ein Molekül, das während der T Zellaktivierung induziert wird, unterdrückt die Suppression, wenn es an Effektorzellen bindet [152]. Außerdem führt die Bindung von 4-1BB, einem Molekül, das an der Aktivierung und dem Überleben von CD4, CD8 und NK Zellen beteiligt ist, ebenfalls zur Entwicklung von Effektor T Zellen, die resistent gegenüber einer Suppression sind [153].

Zusammenfassend wird deutlich, dass Tregs bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von autoimmunen Erkrankungen eine Schlüsselrolle zukommt. Daher kann eine Immuntherapie mit Immunsuppressiva oder monoklonalen Antikörpern, welche den Anteil und die Wirkung von Tregs positiv beeinflussen, die Krankheitserscheinungen bei Autoimmunkrankheiten mildern [154].

#### **4.1.2 TNF- $\alpha$ als therapeutischer Ansatzpunkt**

Im Rahmen dieser Studie wurde der Einfluss verschiedener Therapeutika bei Patienten mit JIA auf die unterschiedlichen Subpopulationen von T Zellen untersucht. Zur medikamentösen Basistherapie gehört MTX, bei erfolgloser Therapie werden TNF- $\alpha$  Inhibitoren eingesetzt [1, 41, 42]. Deshalb kommt TNF- $\alpha$  bei der JIA eine entscheidende Bedeutung zu.

TNF- $\alpha$  ist ein proinflammatorisches Zytokin, wird von Monozyten, aktivierten Makrophagen und T Zellen sezerniert und besteht aus drei gleichen Untereinheiten. TNF- $\alpha$  Moleküle kommen entweder als Membran-assoziiertes TNF- $\alpha$  (mTNF- $\alpha$ ) auf Zelloberflächen vor oder als freie lösliche TNF- $\alpha$  nach erfolgter Spaltung von mTNF- $\alpha$  durch TNF-alpha-converting-enzym (TACE) [155, 156]. TNF- $\alpha$  löst durch Bindung an 55-kd- und 75 kd-spezifische Rezeptoren an der Zellmembran der Zielzelle [157] über unterschiedliche Signalwege verschiedene zelluläre Mechanismen aus. Diese reichen von der Apoptoseinduktion bis zur Expression von Adhäsionsantigenen und entzündungsaktivierenden Genen. Dazu zählt zum Beispiel NF- $\kappa$ B, welches die Bildung von Entzündungsmediatoren wie Prostaglandinen induziert [157–159].

Des Weiteren kommt es zur Endothelaktivierung, wodurch Entzündungszellen die Blutbahn verlassen und an den Entzündungsort gelangen können [157]. Somit nimmt TNF- $\alpha$  an der Immunhomöostase teil. Es wirkt allerdings nicht nur immunprotektiv im Rahmen von Abwehrreaktionen bei Entzündungen, sondern kann auch für schädliche Wirkungen bei Sepsis und Autoimmunerkrankungen verantwortlich gemacht werden [160]. Studien haben gezeigt, dass eine Dysregulation der TNF-Familie durch eine Überexpression zu exazerbierten und autoaggressiven Entzündungen bis hin zum septischen Schock führen kann [158].

Des Weiteren fördert die TNF-Superfamilie die Sekretion proinflammatorischer Mediatoren, welche bei Autoimmunerkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Psoriasis und lupusähnlichen Syndrome eine Rolle spielen [160]. Einige Untersuchungen legten dar, dass TNF- $\alpha$  bei der Pathogenese der JIA mitwirkt [161, 162]. Insbesondere hat TNF- $\alpha$  Einfluss auf den Proteoglykanhaushalt. Proteoglykane sind ein wichtiger Bestandteil von Knorpelgewebe. Studien zeigten, dass TNF- $\alpha$  die Proteoglykansynthese hemmt und den Proteoglykanabbau fördert. Somit trägt TNF- $\alpha$  zu Knorpeldestruktionen, welche bei Patienten mit RA auftreten, bei [163]. Darüber hinaus ist bekannt, dass Antikörper (Infliximab, Adalimumab), die gegen TNF- $\alpha$  gerichtet sind, die IL-1 Produktion von Synoviozyten bei Patienten mit RA hemmen können. Es wird davon ausgegangen, dass TNF- $\alpha$  am stärksten die Sekretion von IL-1 induziert und somit TNF- $\alpha$  Antikörper auch eine Auswirkung auf IL-1 haben [164]. IL-1 verursacht Knorpelschäden und hat einen proinflammatorischen Effekt wie TNF- $\alpha$  [163]. Außerdem ist TNF- $\alpha$  sowohl im Serum, als auch in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit JIA erhöht. Ferner ist der lösliche TNF-R bei allen Subtypen der JIA erhöht und korreliert mit der Krankheitsaktivität [165].

Weitere Untersuchungen belegten, dass TNF- $\alpha$  und Lymphotoxin- $\alpha$  in der Mehrheit der Synovialproben bei Patienten mit RA nachgewiesen werden konnten. Dies ist ein Hinweis darauf, dass TNF- $\alpha$  lokale Entzündungen verstärken und zu Gelenkdestruktionen führen kann [166].

Insgesamt wird ersichtlich, dass durch die Blockade von TNF- $\alpha$  die Zellaktivierung und Einwanderung der Zellen zum Entzündungsort inhibiert wird. Zusätzlich wird die Aufrechterhaltung der Entzündung verhindert, indem der Zell-Zell-Kontakt und die damit einhergehende gegenseitige Aktivierung gestoppt werden. Schließlich wird durch Inaktivierung der Zytokine die Entzündungskaskade mit Sekretion von proinflammatorischen Prostaglandinen und Prostazyklinen unterbrochen [157]. Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, dass TNF- $\alpha$  einen attraktiven therapeutischen Ansatzpunkt bei Patienten mit JIA darstellt.

## **4.2 Einfluss von immunsuppressiven Therapien auf Th1 Zellen, Th17 und Th17/Th1 Zellen**

### **4.2.1 Wirkung von MTX**

Bei dieser Studie konnte demonstriert werden, dass der Anteil an proinflammatorischen Th1 Zellen und Th17/Th1 Zellen bei JIA Patienten durch die Behandlung mit MTX abnimmt.

Es wird davon ausgegangen, dass MTX zur Apoptose von stark aktivierten T Zellen und zu einer Abnahme der Th1 Zellen beiträgt [43]. Die meisten Untersuchungen beschrieben, dass die Wirkung von MTX auf die Inhibition von Zellproliferation und die Apoptoseinduktion dosis- und zeitabhängig ist [167–169]. Strauss *et al.* zeigten, dass MTX nicht nur in aktivierten Leukozyten Apoptose induziert, sondern auch in ruhenden Zellen [170]. Jedoch wurde die Induktion von Apoptose in ruhenden Zellen nicht in anderen Untersuchungen nachgewiesen [168, 171, 172]. Des Weiteren zeigten Yamaki *et al.* bei Mäusen, die nach Stimulation mit Ovalbumin, einem Protein, das allergische Reaktionen auslöst, auf, dass die IFN- $\gamma$  Sekretion unter MTX Behandlung deutlich abnahm, was für eine Suppression der Th1 Zellen spricht. Die Abschwächung der Th1 Antwort könnte die antiinflammatorische Wirkung von MTX bei Patienten mit rheumatoider Arthritis erklären [173].

Weiterhin wurde in dieser Arbeit dargelegt, dass der Anteil an Th17 Zellen bei JIA Patienten unter MTX Behandlung unverändert bleibt. Ursache dafür könnte die Plastizität von T Zellen sein [49], die dazu führt, dass Th17 Zellen zu Th1 Zellen shiften. In weiteren Studien, in welchen IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> Zellen mit IL-12 stimuliert worden sind, wurde gezeigt, dass die Stimulation zur verminderten Sekretion von IL-17 führt und die Produktion von IFN- $\gamma$  induziert wird. Folglich wird deutlich, dass Th17 Zellen anfällig für die Umwandlung zu Th1 Zellen sind. Zusätzlich führen IFN- $\gamma$  und T-bet, Zytokin und Transkriptionsfaktor von Th1 Zellen, zur Anreicherung von Th17 Gedächtniszellen [49].

#### **4.2.2 Effekt von TNF- $\alpha$ Inhibitoren auf regulatorische T Zellen, Th1 Zellen, Th17 und Th17/Th1 Zellen**

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass der Anteil an regulatorischen T Zellen bei Patienten mit JIA durch Behandlung mit MTX und Etanercept ansteigt.

Unsere Ergebnisse stimmten mit den Studien von Ehrenstein *et al.* überein, die bei RA Patienten, welche auf die Therapie mit TNF- $\alpha$  Inhibitoren ansprachen, einen signifikanten Anstieg an Tregs im Peripherblut zeigten [174]. Dieser Anstieg korrelierte mit dem Rückgang der CRP Werte [116]. TNF- $\alpha$  hat die Fähigkeit zur Apoptoseinduktion, weshalb die Blockade von TNF- $\alpha$  eine Erklärung für den Anstieg an Tregs sein kann [175]. Des Weiteren hat die Behandlung von RA Patienten mit TNF- $\alpha$  Inhibitoren (Infliximab) Tregs befähigt, die Zytokinproduktion zu inhibieren und „konventionelle“ T Zellen in den suppressiven Phänotyp zu überführen. In Abwesenheit von TNF- $\alpha$  Inhibitoren wiesen Tregs bei Patienten mit RA diese Fähigkeiten nicht auf [116]. Dies verdeutlicht, dass regulatorische T Zellen durch TNF- $\alpha$  Inhibitoren beeinflusst werden können und dadurch die Krankheitsaktivität gemildert werden kann. Eine weitere Studie, die unsere Ergebnisse untermauert, ist die von Valencia *et al.*, welche *in vitro* zeigte, dass TNF- $\alpha$  die FoxP3 Transkription und Translation in isolierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs von Patienten mit aktiver RA inhibiert und dadurch Tregs die Proliferation von Effektorzellen nicht supprimieren können.

Durch Behandlung mit TNF- $\alpha$  Inhibitoren (Infliximab) stieg die FoxP3 mRNA und Proteinexpression von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs und die Suppressorfunktion von Tregs wurde wiederhergestellt [145].

Andere Untersuchungen von Blache *et al.* legten jedoch dar, dass weder Etanercept noch Adalimumab einen Einfluss auf Tregs ausübten. Die Messungen fanden sechs und zwölf Wochen nach Therapiebeginn statt und der Anteil an Treg Zellen betrug 4–5 % aller CD4<sup>+</sup> Zellen. Nach der Behandlung nahm die Dichte an regulatorischen T Zellen nicht zu, sie zeigte sogar einen Abwärtstrend [117]. Vigna-Perez *et al.* zeigten in einer Studie, dass bei RA Patienten mit Adalimumab Behandlung ein leichter, aber signifikanter Anstieg an Tregs nur am 15. Tag nach Therapiebeginn mit einem TNF- $\alpha$  Inhibitor festzustellen war. Darüber hinaus wurde ein erhöhter prozentualer Anteil an apoptotischen Zellen im Peripherblut am 15. Tag der Adalimumab Therapie gemessen. Unerwarteterweise wurden diese Beobachtungen am 180. Tag der Behandlung mit Adalimumab nicht mehr gemacht. Demnach wird davon ausgegangen, dass TNF- $\alpha$  Inhibitoren nur vorübergehend einen Einfluss auf die regulatorischen T Zellen haben [176]. Weitere Experimente von Dombrecht *et al.* verdeutlichten die antiinflammatorische Wirkung von TNF- $\alpha$  Inhibitoren durch den Rückgang von klinischen und biologischen Krankheitsparametern sowie von aktivierten CD4<sup>+</sup> T Zellen. Jedoch konnte kein Effekt auf die dendritischen und regulatorischen Zellen nachgewiesen werden [177].

Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass bei JIA Patienten, die mit MTX und Etanercept behandelt wurden, der Anteil an Th1 Zellen signifikant abnimmt. Dies könnte im unmittelbaren Zusammenhang mit der Hochregulation von Tregs stehen, welche zur Balance der Immunhomöostase beitragen und so den Th1 Anteil verringern [58, 111]. JIA Patienten, die MTX und Adalimumab erhielten, hatten keinen signifikanten Unterschied am Anteil der Tregs, Th1 und Th17 Zellen.

Gründe dafür können sein, dass der Stichprobenumfang von JIA Patienten, die mit MTX und Adalimumab behandelt wurden, zu gering war (Tregs n=3, Th1/Th17 n=2). Ferner spielen die unterschiedlichen Angriffsorte von den TNF-

$\alpha$  Inhibitoren eine Rolle. Während das gentechnologisch hergestellte Fusionsprotein Etanercept sowohl TNF- $\alpha$  als auch TNF- $\beta$  inhibiert [44, 45], binden die monoklonalen Antikörper Adalimumab (human) und Infliximab (chimär) nur TNF- $\alpha$  [178] (s. 1.1.5.2). Somit wird die Signalkaskade die durch TNF- $\alpha$  vermittelt wird, unterbunden. Der Effekt von Etanercept auf die Th1 Zellen, könnte dadurch erklärt werden, dass Th1 Zellen TNF- $\beta$  (Lymphotoxin- $\alpha$  = LT $\alpha$ ) sezernieren [69].

Die unterschiedlichen Angriffspunkte der einzelnen TNF- $\alpha$  Inhibitoren wurden in einer Studie von Sandborn *et al.* genauer untersucht [179]. Diese zeigte, dass bei Patienten mit M. Crohn nur Adalimumab und Infliximab zu klinischer Besserung führten, weshalb die Pharmakokinetik der drei Therapeutika genauer untersucht wurde [180]. Es wurde herausgefunden, dass die Bindungseigenschaften von Etanercept, Adalimumab und Infliximab zu löslichem TNF- $\alpha$  ähnlich stark waren, wobei Etanercept die stärkste Avidität zum löslichen TNF- $\alpha$  aufwies. Gegenüber mTNF- $\alpha$  waren die Bindungseigenschaften aller drei Biologika nahezu gleich. Daraus folgend wird angenommen, dass der unterschiedliche klinische Effekt nicht auf die Bindungseigenschaften von Etanercept, Adalimumab und Infliximab zurückzuführen ist [180].

Darüber hinaus blieb in dieser Studie der Anteil an Th17 Zellen bei JIA Patienten mit MTX und Etanercept Behandlung unverändert, was mit der Plastizität von T Zellen erklärt werden könnte (s. 4.3), weil der Anteil an Th1 Zellen zunahm. *In vitro* wurde dargelegt, dass Th17 Zellen plastisch sind und zu Th1 Zellen konvertieren können. Das bedeutet, dass Therapien, welche die Induktion von Th17 Zellen verhindern, auch eine Auswirkung auf Th17/Th1 und Th1 Zellen haben könnten [181].

### **4.3 Verhältnis von regulatorischen T Zellen zu Th1 und Th17 Zellen**

Eine autoimmune Inflammation wird ausgelöst, wenn die Immunhomöostase gestört ist und eine Verschiebung der T Zellen zugunsten der Effektorzellen

erfolgt. Im Rahmen dieser Studie wurde gezeigt, dass sich bei JIA Patienten unter Etanercept und Methotrexat der Anteil von regulatorischen T Zellen wechselseitig zum Anteil an Th1 Zellen verändert.

Studien deuteten anfangs darauf hin, dass sich die Entwicklungswege zwischen Th17/Th1 Untergruppen und Th17/Tregs Untergruppen reziprok verhalten. Es wurden zahlreiche Mechanismen entdeckt, bei denen Th1 und Th2 Zellen der Bildung von Th17 Zellen entgegenwirken [49]. Allerdings zeigten neuere Untersuchungen, dass die differenzierten Th17 Zellen gegenüber der Polarisierung zu Th1 Zellen empfänglich sind und die Th1 Faktoren IFN- $\gamma$  und T-bet zur Anreicherung von Th17 Gedächtniszellen führen. Zusätzlich deuteten neuere Daten an, dass eine Untergruppe von regulatorischen T Zellen eine Spätphasen-Plastizität aufweist, die selektiv angeregt werden kann, einen Th17 Phänotyp anzunehmen. Durch das Erforschen der Mechanismen, die den Phänotyp Wechsel erleichtern, wird die Flexibilität der T Zell Differenzierung verdeutlicht [49]. Zusätzlich fanden Saito *et al.* im Rahmen von Untersuchungen der CD4<sup>+</sup> Zellen bei Schwangeren heraus, dass die Plastizität darin begründet ist, dass sich Progenitorzellen zu intermediären Th17/Treg Zellen entwickeln, welche ROR $\gamma$ t und FoxP3 exprimieren. Da sowohl Th17 als auch Tregs TGF- $\beta$ 1 benötigen, entscheidet das Zytokinmilieu über die weitere Entwicklung. Wenn Mikroorganismen dendritische Zellen zur Produktion von IL-6 und IL-1 aktivieren, entwickeln sich Th17 Zellen [182]. Des Weiteren führt PGE<sub>2</sub>, ein Mediator von Gewebsentzündung, zur vermehrten Expression von IL-23R und IL-1R und zur weiteren Bildung von Th17 Zellen. Es ist bekannt, dass sich Tregs zu Th17 Zellen umwandeln können und dabei IL-1 $\beta$  und IL-2 die Schlüsselzytokine sind. Diese Untersuchungen belegen, dass die Th1/Th17 und Tregs Zelllinien miteinander verbunden sind und fähig sind, in andere Zelllinien zu konvertieren [111].

Weiterhin zeigten Eastaff *et al.* bei Patienten mit CEDs, dass im Peripherblut die regulatorischen T Zellen verringert und die Th17 Zellen erhöht sind. Des Weiteren wurde in der Darmschleimhaut ein entzündliches Mikroumfeld mit proinflammatorischen Zytokinen wie IL-17a, IL-1 $\beta$  und IL-6 nachgewiesen. Insbesondere IL-1 $\beta$  und IL-6 tragen zur Aufrechterhaltung von Entzündungsantworten und

Entwicklung von Th17 Zellen bei [95, 183]. Darüber hinaus wurde dargestellt, dass IL-6 fähig ist, die Funktion von regulatorischen T Zellen zu hemmen [184, 185]. Insgesamt wird vermutet, dass durch das proinflammatorische Zytokinmikroumfeld die Balance zwischen Tregs und Teffs gestört wird. Durch die Messung erhöhter Spiegel von FoxP3 und IL-17a in der Darmschleimhaut wird vermutet, dass sich regulatorische Zellen in der Schleimhaut anhäufen, jedoch aufgrund des Zytokinmilieus nicht greifen können und der Anteil an Th17 Zellen überwiegt [186].

#### **4.4 Weitere Therapiemöglichkeiten der JIA**

Durch die kontinuierlichen Erkenntnisse hinsichtlich der Immunantwort und dem Entzündungsprozess der JIA und durch die Entwicklung von Medikamenten, die selektiv einzelne Moleküle oder Signalwege inhibieren, ergeben sich neue Einblicke in die Pathogenese der Erkrankung und damit weitere Therapiemöglichkeiten [1]. Andere Angriffspunkte für Therapeutika sind beispielsweise IL-6 und IL-1, welche zur Differenzierung von Th17 Zellen (s. 1.2.3) beitragen. Tocilizumab, ein humaner rekombinanter monoklonaler Antikörper, bindet an IL-6 Rezeptoren und verhindert so das Binden von IL-6 an den spezifischen Rezeptor. Durch diese Hemmung des IL-6 Signalweges wird die Entzündungsreaktion unterbrochen. Eine klinische Studie zeigte, dass bei Patienten mit dem systemischen Subtyp die Behandlung mit einem IL-6-R Antagonisten zur klinischen Besserung führt und Akute-Phase Proteine ein normales Level erreichen [187, 188]. Zu den Akute Phase Proteinen, welche im Rahmen von einer Immunantwort gebildet werden, gehören CRP, Serum-Amyloid-A (SAA) und Fibrinogen [189]. Des Weiteren stellten De Benedetti *et al.* eine Korrelation zwischen den IL-6 Serumwerten und der Gelenkbeteiligung und Thrombozytose fest [33]. Zusätzlich ist IL-6 bei der polyartikulären Verlaufsform in der Synovialflüssigkeit erhöht [47].

Weitere Therapiealternativen stellen die IL-1 Zytokinantagonisten (anti-IL-1-R) Anakinra, Canakinumab und Rilonacept dar. Anakinra erwies sich bisher bei der Therapie der Rheumatoiden Arthritis als wirksam [190]. Bei Kindern wird Anakinra zulassungsüberschreitend (Off-Label-Use) bei systemischer Arthritis

und dem Still-Syndrom angewandt [157], bei dem ein Nutzen nachgewiesen werden konnte [191–197]. Hervorzuheben ist, dass das Fortschreiten von radiologischen Gelenkveränderungen durch die Behandlung mit Anakinra positiv beeinflusst werden konnte [198]. Allerdings verursachte die Kombinationstherapie von Anakinra mit Etanercept vermehrt schwere Infektionen, Hautreaktionen an der Einstichstelle und Neutropenien, weshalb nur Monotherapien zu empfehlen sind [199]. Bemerkenswert ist, dass Patienten mit systemischer JIA, welche erhöhte IL-6 Konzentrationen aufwiesen, durch die Behandlung mit einem IL-1Ra, normale IL-6 Spiegel erlangten [200].

#### **4.5 Gesamtbeurteilung und zusammenfassender Ausblick**

Die JIA umfasst eine Gruppe von Arthritiden unbekannter Ätiologie bei Kindern und Jugendlichen unter 16 Jahren. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Anteil antiinflammatorischer regulatorischer T Zellen bei JIA Patienten unter MTX und Etanercept Behandlung zunimmt und sich der Anteil proinflammatorischer Th1 Zellen verringert. Dieses Ergebnis könnte einen Grund für den therapeutischen Effekt von TNF- $\alpha$  Inhibitoren liefern. Darüber hinaus wurde im Rahmen dieser Arbeit dargestellt, dass der Anteil proinflammatorischer Th1 und Th17/Th1 Zellen bei JIA Patienten durch die Behandlung mit MTX abnimmt, was ein Mechanismus der Wirksamkeit von MTX sein könnte.

Interessanterweise konnte kein Unterschied am Anteil von Th17 Zellen unter den verschiedenen Behandlungen bei JIA Patienten gemessen werden, was eventuell auf die Plastizität der Zelllinien zurückgeführt werden kann.

Durch die Kenntnis über die Plastizität der T Zellen und die Mechanismen, die zum Phänotypwechsel führen, ist es möglich, Immuntherapien so zu entwickeln, dass sie in Zelllinien-spezifische T Zellantworten eingreifen. Somit kann durch eine Neutralisierung von Zytokinen, die zur Differenzierung einer Zelllinie beitragen, die Entwicklung proinflammatorischer Zellen gezielt gehemmt werden. Folglich kann durch Blockade von IL-1 $\beta$  und IL-6 die Th17

Zell Differenzierung inhibiert werden [186]. Dadurch ist es möglich, die Balance zwischen pathogenen und regulatorischen T Zellen zu beeinflussen und die Homöostase wiederherzustellen [49].

## 5 Zusammenfassung

Die Juvenile Idiopathische Arthritis (JIA) ist eine Autoimmunerkrankung, die eine Gruppe heterogener Arthritiden unbekannter Ätiologie bei Kindern unter 16 Jahren kennzeichnet.

Diese Studie befasste sich damit, wie verschiedene Medikamente, die als Standardtherapie bei Patienten mit JIA eingesetzt werden, auf zellulärer Ebene wirken. Dabei wurden insbesondere  $CD4^+$  T Zellen, darunter regulatorische T Zellen, und die Effektorzellen vom Th1- und Th17-Typ untersucht.

Es ist bekannt, dass regulatorische T Zellen bei der Immunhomöostase und Erhaltung der Selbsttoleranz eine wichtige Rolle spielen. Demgegenüber werden Th1 und Th17 Zellen aufgrund der Sekretion von Zytokinen proinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben.

Im Rahmen dieser Studie wurde Peripherblut von Kindern und Jugendlichen mit JIA, die mit Methotrexat (MTX), einem Antimetabolit, alleine oder in Kombination mit Etanercept oder Adalimumab, TNF- $\alpha$  Inhibitoren, behandelt worden sind, *ex vivo* auf den Anteil der unterschiedlichen  $CD4^+$  Zellen untersucht und mit Peripherblut gesunder Spender verglichen.

Dabei konnte gezeigt werden, dass der Anteil an regulatorischen T Zellen bei JIA Patienten mit MTX und Etanercept Behandlung signifikant zunahm, wohingegen der Anteil an Th1 Zellen abnahm. Zusätzlich erwies sich bei JIA Patienten durch die unterschiedlichen Behandlungen kein Unterschied im Anteil von Th17 Zellen. Ferner wurde dargestellt, dass sich der Anteil von Th1 und Th1/Th17 Zellen bei JIA Patienten mit MTX Behandlung verringerte.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass MTX und TNF- $\alpha$  Inhibitoren bei JIA Patienten auch auf zellulärer Ebene wirken. Des Weiteren wird vermutet, dass die einzelnen Zelllinien plastisch sind und sich dadurch das Verhältnis der regulatorischen T Zellen zu den Effektorzellen Th1 und Th17 im Rahmen von Entzündungsprozessen verändert.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Ravelli A and Martini A (2007) Juvenile idiopathic arthritis. *Lancet* **369**(9563): 767-778.
2. Consolaro A et al. (2012) Seeking insights into the EPidemiology, treatment and Outcome of Childhood Arthritis through a multinational collaborative effort: Introduction of the EPOCA study. *Pediatr Rheumatol Online J* **10**(1): 39.
3. von Koskull S et al. (2001) Incidence and prevalence of juvenile arthritis in an urban population of southern Germany: a prospective study. *Ann Rheum Dis* **60**(10): 940-945.
4. Minden K (2007) Epidemiologie der Juvenilen Idiopathischen Arthritis. Springer Medizin Verlag Heidelberg.
5. Manners PJ and Bower C (2002) Worldwide prevalence of juvenile arthritis why does it vary so much? *J Rheumatol* **29**(7): 1520-1530.
6. Horneff G and Wahn V (2014) Juvenile idiopathische Arthritis. In: Reinhardt D (Ed.) Therapie der Krankheiten im Kindes- und Jugendalter. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 341-348.
7. Benseler S and Brunner J (2007) Untersuchungstechniken. In: Wagner N and Dannecker G (Eds.) Pädiatrische Rheumatologie. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 83.
8. Haas JP (2007) Genetik. In: Wagner N and Dannecker G (Eds.) Pädiatrische Rheumatologie. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 39.
9. Burgos-Vargas R (1993) Spondyloarthropathies and psoriatic arthritis in children. *Curr Opin Rheumatol* **5**(5): 634-643.
10. Arnett FC (1987) Seronegative spondylarthropathies. *Bull Rheum Dis* **37**(1): 1-12.
11. Burgos-Vargas R and Pineda C (1991) New clinical and radiographic features of the seronegative spondyloarthropathies. *Curr Opin Rheumatol* **3**(4): 562-574.
12. Merino R, De Inocencio J and Garcia-Consuegra J (2001) Evaluation of ILAR classification criteria for juvenile idiopathic arthritis in Spanish children. *J Rheumatol* **28**(12): 2731-2736.
13. Dannecker GE and Quartier P (2009) Juvenile idiopathic arthritis: classification, clinical presentation and current treatments. *Horm Res* **72 Suppl 1**: 4-12.
14. Petty RE (2001) Growing pains: the ILAR classification of juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* **28**(5): 927-928.
15. Duckers G, Niehues T (2011) Rheuma bei Kindern und Jugendlichen: Juvenile Idiopathische Arthritis (JIA). *Monatsschrift Kinderheilkunde* **159**(1): 25-33.
16. Ferucci ED et al. (2005) Antibodies against cyclic citrullinated peptide are associated with HLA-DR4 in simplex and multiplex polyarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **52**(1): 239-246.

17. Niehues T, Feyen O and Teliëps T. (2008) Concepts on the pathogenesis of juvenile idiopathic arthritis]. *Z Rheumatol*, 2008. **67**(2): 111-6, 118-120.
18. Masters SL et al. (2009) Horror autoinflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease (\*). *Annu Rev Immunol* **27**: 621-668.
19. Murray KJ et al. (1996) Immunohistological characteristics of T cell infiltrates in different forms of childhood onset chronic arthritis. *J Rheumatol* **23**(12): 2116-2124.
20. Gregorio A et al. (2007) Lymphoid neogenesis in juvenile idiopathic arthritis correlates with ANA positivity and plasma cells infiltration. *Rheumatology (Oxford)* **46**(2): 308-313.
21. Ruprecht CR et al. (2005) Coexpression of CD25 and CD27 identifies FoxP3+ regulatory T cells in inflamed synovia. *J Exp Med* **201**(11): 1793-1803.
22. de Kleer IM et al. (2004) CD4+CD25bright regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. *J Immunol* **172**(10): 6435-6443.
23. Thompson SD et al. (2004) A genome-wide scan for juvenile rheumatoid arthritis in affected sibpair families provides evidence of linkage. *Arthritis Rheum* **50**(9): 2920-2930.
24. Grom AA and Hirsch R (2000) T-cell and T-cell receptor abnormalities in the immunopathogenesis of juvenile rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* **12**(5): 420-424.
25. Wedderburn LR et al. (2000) Selective recruitment of polarized T cells expressing CCR5 and CXCR3 to the inflamed joints of children with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* **43**(4): 765-774.
26. Gattorno, M et al. (2005) Phenotypic and functional characterisation of CCR7+ and CCR7- CD4+ memory T cells homing to the joints in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res Ther* **7**(2): R256-267.
27. Clemens LE, Albert E and Ansell BM (1983) HLA studies in IgM rheumatoid-factor-positive arthritis of childhood. *Ann Rheum Dis* **42**(4): 431-434.
28. Thomson W et al. (2002) Juvenile idiopathic arthritis classified by the ILAR criteria: HLA associations in UK patients. *Rheumatology (Oxford)* **41**(10): 1183-1189.
29. de Benedetti F et al. (2003) Functional and prognostic relevance of the -173 polymorphism of the macrophage migration inhibitory factor gene in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* **48**(5): 1398-1407.
30. Fishman D et al. (1998) The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* **102**(7): 1369-1376.

31. Ogilvie EM et al. (2003) The -174G allele of the interleukin-6 gene confers susceptibility to systemic arthritis in children: a multicenter study using simplex and multiplex juvenile idiopathic arthritis families. *Arthritis Rheum* **48**(11): 3202-3206.
32. Donn R et al. (2004) A functional promoter haplotype of macrophage migration inhibitory factor is linked and associated with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* **50**(5): 1604-1610.
33. de Benedetti F et al. (1991) Correlation of serum interleukin-6 levels with joint involvement and thrombocytosis in systemic juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **34**(9): 1158-1163.
34. de Benedetti F et al. (1994) Serum soluble interleukin 6 (IL-6) receptor and IL-6/soluble IL-6 receptor complex in systemic juvenile rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* **93**(5): 2114-2119.
35. Martini A et al. (1994) Intravenous iron therapy for severe anaemia in systemic-onset juvenile chronic arthritis. *Lancet* **344**(8929): 1052-1054.
36. Cazzola M et al. (1996) Defective iron supply for erythropoiesis and adequate endogenous erythropoietin production in the anemia associated with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *Blood* **87**(11): 4824-4830.
37. De Benedetti F et al. (1997) Interleukin 6 causes growth impairment in transgenic mice through a decrease in insulin-like growth factor-I. A model for stunted growth in children with chronic inflammation. *J Clin Invest* **99**(4): 643-650.
38. De Benedetti F and Martini A (1998) Is systemic juvenile rheumatoid arthritis an interleukin 6 mediated disease? *J Rheumatol* **25**(2): 203-207.
39. Pascual V et al. (2005) Role of interleukin-1 (IL-1) in the pathogenesis of systemic onset juvenile idiopathic arthritis and clinical response to IL-1 blockade. *J Exp Med* **201**(9): 1479-1486.
40. Dent PB and Walker N (1998) Intra-articular corticosteroids in the treatment of juvenile rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* **10**(5): 475-480.
41. Cespedes-Cruz A, Gutiérrez-Suárez R, Pistorio A et al. (2008) Methotrexate improves the health-related quality of life of children with juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis* **67**(3): 309-314.
42. Giannini EH et al. (1992) Methotrexate in resistant juvenile rheumatoid arthritis. Results of the U.S.A.-U.S.S.R. double-blind, placebo-controlled trial. The Pediatric Rheumatology Collaborative Study Group and The Cooperative Children's Study Group. *N Engl J Med* **326**(16): 1043-1049.
43. Wessels JA, Huizinga TW and Guchelaar HJ (2008) Recent insights in the pharmacological actions of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **47**(3): 249-255.
44. Mohler KM et al. (1993) Soluble tumor necrosis factor (TNF-) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF- carriers and TNF- antagonists. *J Immunol* **151**(3): 1548-1561.

45. Lovell DJ et al. (2000) Etanercept in children with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. Pediatric Rheumatology Collaborative Study Group. *N Engl J Med* **342**(11): 763-769.
46. Guzman F (o. J.) Mechanism of action, indications and adverse effects of: etanercept, infliximab and adalimumab, URL: <http://pharmacologycorner.com/mechanism-of-action-indications-and-adverse-effects-of-etanercept-infliximab-and-adalimumab/> [Zugriff: 25.03.2015]
47. Lepore L et al. (1994) Study of IL-2, IL-6, TNF- alpha, IFN- gamma and beta in the serum and synovial fluid of patients with juvenile chronic arthritis. *Clin Exp Rheumatol* **12**(5): 561-565.
48. Woo P (1998) Cytokines in juvenile chronic arthritis. *Baillieres Clin Rheumatol* **12**(2): 219-228.
49. Peck A and Mellins ED (2010) Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. *Immunology* **129**(2): 147-153.
50. Zhu J and Paul WE (2010) Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res* **20**(1): 4-12.
51. Woo P (2002) Cytokines and juvenile idiopathic arthritis. *Curr Rheumatol Rep* **4**(6): 452-457.
52. Gorelik L and Flavell RA (2002) Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol* **2**(1): 46-53.
53. Chen W and Wahl SM (2002) TGF-beta: receptors, signaling pathways and autoimmunity. *Curr Dir Autoimmun* **5**: 62-91.
54. Gorelik L and Flavell RA (2000) Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity* **12**(2): 171-181.
55. Yamagiwa S et al. (2001) A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *J Immunol* **166**(12): 7282-7289.
56. Laurence A and O'Shea JJ (2007) T(H)-17 differentiation: of mice and men. *Nat Immunol* **8**(9): 903-905.
57. Oh S, Rankin AL and Caton AJ (2010) CD4+CD25+ regulatory T cells in autoimmune arthritis. *Immunol Rev* **233**(1): 97-111.
58. Miyara M and Sakaguchi S (2011) Human FoxP3(+)CD4(+) regulatory T cells: their knowns and unknowns. *Immunol Cell Biol* **89**(3): 346-351.
59. Sakaguchi S et al. (2008) Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* **133**(5): 775-787.
60. Sakaguchi S et al. (2006) Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* **212**: 8-27.
61. Asano M et al. (1996) Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med* **184**(2): 387-396.

62. Annacker O et al. (2001) CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol* **166**(5): 3008-3018.
63. Sakaguchi S et al. (2001) Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* **182**: 18-32.
64. Taams LS et al. (2001) Human anergic/suppressive CD4(+)CD25(+) T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur J Immunol* **31**(4): 1122-1131.
65. Shevach EM et al. (2006) The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. *Immunol Rev* **212**: 60-73.
66. Piccirillo CA and Shevach EM (2001) Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol* **167**(3): 1137-1140.
67. Trinchieri G and Sher A (2007) Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* **7**(3): 179-190.
68. Theofilopoulos AN et al. (2001) The role of IFN-gamma in systemic lupus erythematosus: a challenge to the Th1/Th2 paradigm in autoimmunity. *Arthritis Res* **3**(3): 136-141.
69. Prahalad S (2000) Atopy, autoimmunity, and the T(H)1/T(H)2 balance. *J Pediatr* **137**(4): 446-449.
70. Szabo SJ et al. (2000) A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* **100**(6): 655-669.
71. Lighvani AA et al. (2001) T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**(26): 15137-15142.
72. Thierfelder WE et al. (1996) Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* **382**(6587): 171-174.
73. Kaplan MH et al. (1996) Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* **382**(6587): 174-177.
74. Mullen AC et al. (2001) Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* **292**(5523): 1907-1910.
75. Afkarian M et al. (2002) T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nat Immunol* **3**(6): 549-557.
76. Schulz EG et al. (2009) Sequential polarization and imprinting of type 1 T helper lymphocytes by interferon-gamma and interleukin-12. *Immunity* **30**(5): 673-683.
77. Zhu J and Paul WE (2008) CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* **112**(5): 1557-1569.
78. Sallusto F et al. (1998) Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* **187**(6): 875-883.

79. Bonecchi R et al. (1998) Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* **187**(1): 129-134.
80. Loetscher P et al. (1998) CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* **391**(6665): 344-345.
81. Murphy KM and Reiner SL (2002) The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* **2**(12): 933-944.
82. Yang J et al. (2001) IL-18-stimulated GADD45 beta required in cytokine-induced, but not TCR-induced, IFN-gamma production. *Nat Immunol* **2**(2): 157-164.
83. Yao C et al. (2009) Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion. *Nat Med* **15**(6): 633-640.
84. Suzuki Y et al. (1988) Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* **240**(4851): 516-518.
85. Mosmann TR and Coffman RL (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* **7**: 145-173.
86. Paul WE and Seder RA (1994) Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* **76**(2): 241-251.
87. Abbas AK, Murphy KM and Sher A (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**(6603): 787-793.
88. Manel N, Unutmaz D and Littman DR (2008) The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat Immunol* **9**(6): 641-649.
89. Acosta-Rodriguez EV et al. (2007) Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* **8**(6): 639-646.
90. Wilson NJ et al. (2007) Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* **8**(9): 950-957.
91. Laurence A et al. (2007) Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* **26**(3): 371-381.
92. Korn T et al. (2007) IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* **448**(7152): 484-487.
93. Nurieva R. et al. (2007) Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* **448**(7152): 480-483.
94. Zhou L et al. (2007) IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* **8**(9): 967-974.
95. Acosta-Rodriguez EV et al. (2007) Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* **8**(9): 942-949.

96. Notley CA et al. (2008) Blockade of tumor necrosis factor in collagen-induced arthritis reveals a novel immunoregulatory pathway for Th1 and Th17 cells. *J Exp Med* **205**(11): 2491-2497.
97. Evans HG et al. (2009) In vivo activated monocytes from the site of inflammation in humans specifically promote Th17 responses. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**(15): 6232-6237.
98. Weaver CT et al. (2006) Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* **24**(6): 677-688.
99. Milner JD, Sandler NG and Douek DC (2010) Th17 cells, Job's syndrome and HIV: opportunities for bacterial and fungal infections. *Curr Opin HIV AIDS* **5**(2): 179-183.
100. Brustle A et al. (2007) The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol* **8**(9): 958-966.
101. Langrish CL et al. (2005) IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* **201**(2): 233-240.
102. Cua DJ et al. (2003) Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* **421**(6924): 744-748.
103. Murphy CA et al. (2003) Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* **198**(12): 1951-1957.
104. Yen D et al. (2006) IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* **116**(5): 1310-1316.
105. Chabaud M et al. (2001) IL-17 derived from juxta-articular bone and synovium contributes to joint degradation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* **3**(3): 168-177.
106. Gaffen SL (2009) Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol* **9**(8): 556-567.
107. Bettelli E, Oukka M and Kuchroo VK (2007) T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* **8**(4): 345-350.
108. Nistala K et al. (2008) Interleukin-17-producing T cells are enriched in the joints of children with arthritis, but have a reciprocal relationship to regulatory T cell numbers. *Arthritis Rheum* **58**(3): 875-887.
109. Curtis MM and Way SS (2009) Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology* **126**(2): 177-185.
110. Khader SA et al. (2007) IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol* **8**(4): 369-377.
111. Saito S et al. (2010) Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* **63**(6): 601-610.
112. Sakaguchi S (2005) Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* **6**(4): 345-352.

113. Akbar AN et al. (2007) The dynamic co-evolution of memory and regulatory CD4+ T cells in the periphery. *Nat Rev Immunol* **7**(3): 231-237.
114. Chen W et al. (2003) Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* **198**(12): 1875-1886.
115. Sakaguchi S (2000) Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* **101**(5): 455-458.
116. Ehrenstein MR et al. (2004) Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF-alpha therapy. *J Exp Med* **200**(3): 277-285.
117. Blache C et al. (2011) Number and phenotype of rheumatoid arthritis patients' CD4+CD25hi regulatory T cells are not affected by adalimumab or etanercept. *Rheumatology (Oxford)* **50**(10): 1814-1822.
118. Miyara M and Sakaguchi S (2007) Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med* **13**(3): 108-116.
119. Sakaguchi S et al. (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* **155**(3): 1151-1164.
120. Tang Q et al. (2004) In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* **199**(11): 1455-1465.
121. Mottet C, Uhlig HH and Powrie F (2003) Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* **170**(8): 3939-3943.
122. Willcox A et al. (2009) Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol* **155**(2): 173-181.
123. McFarland HF and Martin R (2007) Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol* **8**(9): 913-919.
124. Vigiotta V et al. (2004) Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* **199**(7): 971-979.
125. Venigalla RK et al. (2008) Reduced CD4+,CD25- T cell sensitivity to the suppressive function of CD4+,CD25high,CD127 -/low regulatory T cells in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **58**(7): 2120-2130.
126. Gerli R et al. (2009) Identification of regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* **8**(5): 426-430.
127. Cao D et al. (2003) Isolation and functional characterization of regulatory CD25brightCD4+ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* **33**(1): 215-223.
128. Mottonen M et al. (2005) CD4+ CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* **140**(2): 360-367.

129. Lawson CA et al. (2006) Early rheumatoid arthritis is associated with a deficit in the CD4+CD25high regulatory T cell population in peripheral blood. *Rheumatology (Oxford)* **45**(10): 1210-1217.
130. Izcue A and Powrie F (2008) Special regulatory T-cell review: Regulatory T cells and the intestinal tract--patrolling the frontier. *Immunology* **123**(1): 6-10.
131. Saruta M et al. (2007) Characterization of FOXP3+CD4+ regulatory T cells in Crohn's disease. *Clin Immunol* **125**(3): 281-290.
132. Takahashi M et al. (2006) An inverse correlation of human peripheral blood regulatory T cell frequency with the disease activity of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* **51**(4): 677-686.
133. Maul J et al. (2005) Peripheral and intestinal regulatory CD4+CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **128**(7): 1868-1878.
134. Baadsgaard O et al. (1990) The role of the immune system in the pathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol* **95**(5): 32S-34S.
135. Chen L et al. (2008) Dynamic frequency of CD4+CD25+Foxp3+ Treg cells in psoriasis vulgaris. *J Dermatol Sci* **51**(3): 200-203.
136. Buckner JH (2010) Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)/CD25(+)/FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* **10**(12): 849-859.
137. Liston A and Rudensky AY (2007) Thymic development and peripheral homeostasis of regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* **19**(2): 176-185.
138. Darrasse-Jeze G et al. (2009) Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *J Exp Med* **206**(9): 1853-1862.
139. Yates J et al. (2007) The maintenance of human CD4+ CD25+ regulatory T cell function: IL-2, IL-4, IL-7 and IL-15 preserve optimal suppressive potency in vitro. *Int Immunol* **19**(6): 785-799.
140. Flores-Borja F et al. (2008) Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**(49): 19396-19401.
141. Borsellino G et al. (2007) Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* **110**(4): 1225-1232.
142. Miyara M et al. (2009) Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* **30**(6): 899-911.
143. Astier AL et al. (2006) Alterations in CD46-mediated Tr1 regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest* **116**(12): 3252-3257.
144. Korn T et al. (2007) Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med* **13**(4): 423-431.
145. Valencia X et al. (2006) TNF- downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood* **108**(1): 253-261.

146. Thornton AM et al. (2004) Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J Immunol* **172**(11): 6519-6423.
147. King IL and Segal BN (2005) Cutting edge: IL-12 induces CD4+CD25- T cell activation in the presence of T regulatory cells. *J Immunol* **175**(2): 641-645.
148. Ben Ahmed M et al. (2009) IL-15 renders conventional lymphocytes resistant to suppressive functions of regulatory T cells through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Immunol* **182**(11): 6763-6770.
149. Clough LE et al. (2008) Release from regulatory T cell-mediated suppression during the onset of tissue-specific autoimmunity is associated with elevated IL-21. *J Immunol* **180**(8): 5393-5401.
150. Walker LS (2009) Regulatory T cells overturned: the effectors fight back. *Immunology* **126**(4): 466-474.
151. Yang J et al. (2007) Allograft rejection mediated by memory T cells is resistant to regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**(50): 19954-19959.
152. Takeda I et al. (2004) Distinct roles for the OX40-OX40 ligand interaction in regulatory and nonregulatory T cells. *J Immunol* **172**(6): 3580-3589.
153. Choi BK et al. (2004) 4-1BB-dependent inhibition of immunosuppression by activated CD4+CD25+ T cells. *J Leukoc Biol* **75**(5): 785-791.
154. Miyara M, Wing K and Sakaguchi S (2009) Therapeutic approaches to allergy and autoimmunity based on FoxP3+ regulatory T-cell activation and expansion. *J Allergy Clin Immunol* **123**(4): 749-55; quiz 756-757.
155. Mitoma H, Horiuchi T and Tsukamoto H (2004) Binding activities of infliximab and etanercept to transmembrane tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Gastroenterology* **126**(3): 934-5; author reply 935-936.
156. Mitoma H et al. (2008) Mechanisms for cytotoxic effects of anti-tumor necrosis factor agents on transmembrane tumor necrosis factor  $\alpha$ -expressing cells: comparison among infliximab, etanercept, and adalimumab. *Arthritis Rheum* **58**(5): 1248-1257.
157. Horneff G (2005) Importance of the new biologicals and cytokine antagonists in the treatment of juvenile idiopathic arthritis (JIA). *Z Rheumatol* **64**(5): 317-326.
158. Rahman MM and McFadden G (2006) Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens. *PLoS Pathog* **2**(2): 4.
159. Legler DF et al. (2003) Recruitment of TNF- receptor 1 to lipid rafts is essential for TNF- $\alpha$ -mediated NF- $\kappa$ B activation. *Immunity* **18**(5): 655-664.
160. Hehlgans T and Pfeffer K (2005) The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* **115**(1): 1-20.
161. Dayer JM, Beutler B and Cerami A (1985) Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med* **162**(6): 2163-2168.

162. Bertolini DR et al. (1986) Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature* **319**(6053): 516-518.
163. Saklatvala J (1986) Tumour necrosis factor alpha stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage. *Nature* **322**(6079): 547-549.
164. Brennan FM et al. (1989) Inhibitory effect of TNF- alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet* **2**(8657): 244-247.
165. Mangge H et al. (1995) Serum cytokines in juvenile rheumatoid arthritis. Correlation with conventional inflammation parameters and clinical subtypes. *Arthritis Rheum* **38**(2): 211-220.
166. Grom AA et al. (1996) Patterns of expression of tumor necrosis factor alpha, tumor necrosis factor beta, and their receptors in synovia of patients with juvenile rheumatoid arthritis and juvenile spondylarthropathy. *Arthritis Rheum* **39**(10): 1703-1710.
167. Quemeneur L et al. (2003) Differential control of cell cycle, proliferation, and survival of primary T lymphocytes by purine and pyrimidine nucleotides. *J Immunol* **170**(10): 4986-4995.
168. Phillips DC, Woollard KJ and Griffiths HR (2003) The anti-inflammatory actions of methotrexate are critically dependent upon the production of reactive oxygen species. *Br J Pharmacol* **138**(3): 501-511.
169. Herman S, Zurgil N and Deutsch M (2005) Low dose methotrexate induces apoptosis with reactive oxygen species involvement in T lymphocytic cell lines to a greater extent than in monocytic lines. *Inflamm Res* **54**(7): 273-280.
170. Strauss G, Osen W and Debatin KM (2002) Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T cells by immunosuppressive drugs. *Clin Exp Immunol* **128**(2): 255-266.
171. Herman S et al. (2003) The induction of apoptosis by methotrexate in activated lymphocytes as indicated by fluorescence hyperpolarization: a possible model for predicting methotrexate therapy for rheumatoid arthritis patients. *Cell Struct Funct* **28**(2): 113-122.
172. Hsu PC et al. (2006) Increasing ornithine decarboxylase activity is another way of prolactin preventing methotrexate-induced apoptosis: crosstalk between ODC and BCL-2. *Apoptosis* **11**(3): 389-399.
173. Yamaki K et al. (2003) Effect of methotrexate on Th1 and Th2 immune responses in mice. *J Pharm Pharmacol* **55**(12): 1661-1666.
174. Nadkarni S, Mauri C and Ehrenstein MR (2007) Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta. *J Exp Med* **204**(1): 33-39.
175. Sarin A, Conan-Cibotti M and Henkart PA (1995) Cytotoxic effect of TNF- and lymphotoxin on T lymphoblasts. *J Immunol* **155**(8): 3716-3718.
176. Vigna-Perez M et al. (2005) Immune effects of therapy with Adalimumab in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* **141**(2): 372-380.

177. Dombrecht EJ et al. (2006) Influence of anti-tumor necrosis factor therapy (Adalimumab) on regulatory T cells and dendritic cells in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* **24**(1): 31-37.
178. Locksley RM, Killeen N and Lenardo MJ (2001) The TNF- and TNF-receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell***104**(4): 487-501.
179. Sandborn WJ et al. (2001) Etanercept for active Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* **121**(5): 1088-1094.
180. Kaymakcalan Z et al. (2009) Comparisons of affinities, avidities, and complement activation of adalimumab, infliximab, and etanercept in binding to soluble and membrane tumor necrosis factor. *Clin Immunol* **131**(2): 308-316.
181. Nistala K et al. (2010) Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**(33): 14751-14756.
182. Crome SQ, Wang AY and Levings MK (2010) Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. *Clin Exp Immunol* **159**(2): 109-119.
183. Yang L et al. (2008) IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* **454**(7202): 350-352.
184. Dominitzki S et al. (2007) Cutting edge: trans-signaling via the soluble IL-6R abrogates the induction of FoxP3 in naive CD4+CD25 T cells. *J Immunol* **179**(4): 2041-2045.
185. Pasare C and Medzhitov R (2003) Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* **299**(5609): 1033-1036.
186. Eastaff-Leung N et al. (2010) Foxp3+ regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease. *J Clin Immunol* **30**(1): 80-89.
187. Yokota S et al. (2005) Therapeutic efficacy of humanized recombinant anti-interleukin-6 receptor antibody in children with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* **52**(3): 818-825.
188. de Benedetti F and Martini A (2005) Targeting the interleukin-6 receptor: a new treatment for systemic juvenile idiopathic arthritis? *Arthritis Rheum* **52**(3): 687-93.
189. Hirota H (1995) Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**(11): 4862-4866.
190. Bresnihan B et al. (1998) Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum* **41**(12): 2196-2204.

191. Swart JF et al. (2010) The efficacy and safety of interleukin-1-receptor antagonist anakinra in the treatment of systemic juvenile idiopathic arthritis. *Expert Opin Biol Ther* **10**(12): 1743-1752.
192. Henrickson M and Reiff A (2004) Prolonged efficacy of etanercept in refractory enthesitis-related arthritis. *J Rheumatol* **31**(10): 2055-2061.
193. Kalliolias GD et al. (2007) Anakinra treatment in patients with adult-onset Still's disease is fast, effective, safe and steroid sparing: experience from an uncontrolled trial. *Ann Rheum Dis* **66**(6): 842-843.
194. Lequerre T et al. (2008) Interleukin-1 receptor antagonist (anakinra) treatment in patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis or adult onset Still disease: preliminary experience in France. *Ann Rheum Dis* **67**(3): 302-308.
195. Maier J et al. (2008) Effective treatment of steroid refractory adult-onset Still's disease with anakinra. *J Rheumatol* **35**(5): 939-941.
196. Quartier P. et al. (2011) A multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial with the interleukin-1 receptor antagonist anakinra in patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis (ANAJIS trial). *Ann Rheum Dis* **70**(5): 747-754.
197. Gattorno M. et al. (2008) The pattern of response to anti-interleukin-1 treatment distinguishes two subsets of patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* **58**(5): 1505-1515.
198. Jiang Y et al. (2000) A multicenter, double-blind, dose-ranging, randomized, placebo-controlled study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis: radiologic progression and correlation of Genant and Larsen scores. *Arthritis Rheum* **43**(5): 1001-1009.
199. Genovese MC et al. (2004) Combination therapy with etanercept and anakinra in the treatment of patients with rheumatoid arthritis who have been treated unsuccessfully with methotrexate. *Arthritis Rheum* **50**(5): 1412-1419.
200. Hoffman HM et al. (2004) Prevention of cold-associated acute inflammation in familial cold autoinflammatory syndrome by interleukin-1 receptor antagonist. *Lancet* **364**(9447): 1779-1785.

## 7 Erklärung zum Eigenanteil

Ich erkläre hiermit, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel: „Einfluss von TNF- $\alpha$  Inhibitoren auf zellulärer Ebene bei der Juvenilen Idiopathischen Arthritis“ selbständig ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit einer Geldstrafe bestraft wird. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

1. PD Dr. Ursula Holzer/ Universitätskinderklinik Tübingen
2. Dr. Katharina Reinhardt/ Universitätskinderklinik Tübingen

Die Studie wurde von Frau PD Dr. Ursula Holzer konzipiert. Die Patientendaten und -proben wurden von Frau PD Dr. Jasmin Kümmerle-Deschner, Frau Dr. Monika Moll, Frau Dr. Julia Czajkowski, Herrn Dr. Nikolaus Rieber aus der Rheumaambulanz der Universitätskinderklinik Tübingen sowie Herrn Dr. Anton Hospach und Herrn Dr. Jan Maier des Olgahospitals in Stuttgart zur Verfügung gestellt.

Die vorgelegte Dissertation wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Mit der Arbeit wurde weder ein akademischer Grad erworben noch eine staatliche Prüfung absolviert. oder bereits bei der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen Abteilung I, Hoppe-Seyler-Str. 1, 72076 Tübingen als Dissertation vorgelegt. Das Verfahren endete wie folgt .... Den Grad eines Dr. med. habe ich noch nicht erworben.

Mir ist bekannt, dass falsche oder unvollständige Angaben zur Folge haben können, dass die Fakultät ein Verfahren zur Entziehung eines eventuell verliehenen akademischen Titels einleitet.

München, 30.03.15

Helga Gross

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Professor Dr. Rupert Handgretinger

und

Frau PD Dr. Ursula Holzer,

für die Bereitstellung des Promotionsthemas und Arbeitsplatzes  
und die sehr gute Betreuung

sowie

Frau Dr. Katharina Reinhardt,

für die gute Einarbeitung, stetige Unterstützung und herzliche Art

Vielen Dank an

Frau PD Dr. Jasmin Kümmerle-Deschner

Frau Dr. Monika Moll

Frau Dr. Julia Czajkowski

Herrn Dr. Nikolaus Rieber

Herrn Dr. Anton Hospach

Herrn Dr. Jan Maier

den Kindern und Jugendlichen, die an der Studie teilnahmen,  
dem Team der Rheumaambulanz der Universitätskinderklinik Tübingen und des  
Olgahospitals Stuttgart,  
die mir Patientendaten und Probenmaterial zu Verfügung stellten.

Danke an Karin Melanie Cabanillas Stanchi, Dr. Michaela Döring,

Dr. Markus Mezger, Barbara Goecke, Iris Schäfer

und

alle hier nicht genannten Mitarbeiter  
der AG Holzer, AG André und AG Schilbach  
für die nette Arbeitsatmosphäre und Hilfe bei jeglichen Fragen.