

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln  
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Hallek

# **Wirkung von Koffein auf die IFN- $\gamma$ Produktion in Th1-Zellen bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der [zahnärztlichen] Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Lydia Gloyer  
aus Duisburg

promoviert am 14. April 2025

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln  
Druckjahr 2025

Dekanin/Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Professor Dr. med. D. M. G. Kofler
2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. B. Brachvogel

## Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift 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.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Akquirierung der Blutproben der Patienten erfolgte in der Rheumatologischen Ambulanz der Uniklinik Köln.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. David Kofler und  
Frau Dr. nat. med. Anja Meyer M.Sc.

von mir selbst ausgeführt worden. Dazu gehören die Isolation der CD4+ Zellen aus dem Patientenvollblut mittels Zentrifugation (PAN-Biotech, Aidenbach, Germany) und des T-Zell Isolationskits (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) sowie die Zellzählung mittels CellCountess (Life Technologies, Darmstadt, Germany), die *in vitro* Kultivierung der CD4+ Zellen mit Koffein (Sigma Aldrich, Hamburg, Germany), die Durchflusszytometrie mit dem Cytifix-Perm/Wash Kit (BD Biosciences, Heidelberg, Germany), das IFN- $\gamma$  und IL-17 und Life-Dead-Staining (ThermoFisher Scientific, Schwerte, Germany) durch das Galileos 10/3 flow cytometer (Beckman Coulter, Krefeld, Germany) sowie die statistischen Auswertungen mittels GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) mittels dem nicht parametrischen Mann-Whitney Test.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 30.07.2024

Unterschrift: .....

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all den Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. David Kofler für die ausgezeichnete Betreuung und die enorme Unterstützung bei der Durchführung der gesamten Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. nat. med. Anja Meyer M.Sc. und Viktoria Golumba-Nagy für die hervorragende Anleitung und Unterstützung in der Durchführung der Experimente bedanken.

Auch möchte ich meinem fantastischem Mitdoktoranden-Laborteam bestehend aus Mara Dittrich-Salomon, Thom Haak, Konstantin Kotschenreuter und S Yan einen großen Dank aussprechen für eine großartige Zusammenarbeit und die aufmunternden Worte und Ratschläge.

Bei dieser Gelegenheit danke ich dem Köln Fortune Programm der medizinischen Fakultät der Universität zu Köln für die finanzielle Unterstützung und für die Durchsicht dieser Arbeit geht besonderer Dank an Jan Paus.

Zu guter Letzt danke ich meinen Freunden, Kommilitonen und Arbeitskollegen für ihre konstanten Ermutigungen und Zusprüche während des Studiums und der Arbeit an dieser Doktorarbeit.

Widmung

Diese Arbeit ist allen Patient\*innen mit Rheumatoider Arthritis gewidmet.

Weiterhin dürfen sich alle Kaffeelieber\*innen angesprochen fühlen.

Es liegt mir fern, jemandem den Morgenkaffee zu vermiesen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>8</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>11</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>12</b>
2.1. Rheumatoide Arthritis	12
2.1.1. Klinik	12
2.1.2. Diagnostik	13
(1) Rheumafaktor (RF) und Anti-Citrullinated Protein Antikörper (Anti-CCP-AK oder ACPA) 14	
2.1.3. Therapie	15
2.1.4. Pathogenese von RA	15
(1) Genetische Prädisposition, epigenetische und posttranslationale Modifikationen	16
(2) Zelluläre Hauptakteure in der Pathogenese von RA	16
(a) Synovialfibroblasten	17
(b) Makrophagen	18
(c) Neutrophile Granulozyten und Dendritische Zellen (DCs)	19
(d) B-Zellen	19
(e) Th1-Zellen und IFN- $\gamma$	20
(f) Th17-Zellen, IL-17 und T <sub>reg</sub> -Zellen	22
(g) Weitere Th-Subtypen in der RA	24
(3) Umweltbedingte (beeinflussbare) Risikofaktoren	25
2.2. Kaffee	26
2.2.1. Pharmakologische Aspekte von Koffein	26
2.2.2. Molekulare Ansatzpunkte von Koffein	27
(1) Adenosin und Adenosinrezeptoren (AR)	28
(2) Koffein als Phosphodiesterase (PDE-) Hemmer	29
2.2.3. Physiologische Wirkung von Koffein	30
(1) Wirkung von Koffein auf die Zellen des Immunsystems	30
2.2.4. Wirkung von Koffein bei Erkrankungen	31
2.2.5. Kaffeekonsum und RA	31
2.3. Fragestellungen und Ziel der Arbeit	34
<b>3. PUBLIKATION</b>	<b>35</b>
3.1. Accepted Manuscript der Originalpublikation	35

<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>53</b>
4.1.	Limitationen und Stärken der Arbeit	53
4.2.	Einordnung der Ergebnisse dieser Dissertation in den aktuellen Forschungsstand zum Einfluss von Koffein auf die RA	54
4.2.1.	Bedeutung für Forschung und klinische Relevanz	54
(1)	Koffeinwirkung: zu erwartende Effekte	54
(2)	Rolle des Mikrobioms	56
(a)	Das Mikrobiom und Koffein	57
(b)	Das Mikrobiom und RA	58
(i)	<i>P. copri</i> in RA	59
(i)	Segmentierte Fadenbakterien (SFB) in RA	60
(c)	Das Mikrobiom, RA und Koffein	61
4.2.2.	Kaffee und MTX	62
4.3.	Schlussfolgerung	62
<b>5.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>64</b>
<b>6.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>76</b>
6.1.	Abbildungsverzeichnis	76
6.2.	Tabellenverzeichnis	76
6.3.	Graphen und Supplemental Material der Originalpublikation	77
6.3.1.	Figure 1	77
6.3.2.	Figure 2	77
6.3.3.	Figure 3	77
6.3.4.	Supplementary table S1	78
6.3.5.	Supplementary figure S1	78
6.3.6.	Supplementary figure S2	79
6.3.7.	Supplementary figure S3	80
6.3.8.	Supplementary figure S4	81

## Abkürzungsverzeichnis

ACPA	Anti-Citrullinated Protein Antikörper
ACPA+	Anti-Citrullinated Protein Antikörper positiv
ACR	engl. American College of Rheumatology
AICAR	5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-Ribonukleotid
AMP	Adenosinmonophosphat
Anti-CCP-Ak	Anti-Citrullinated Protein Antikörper
APRIL	engl. a proliferating inducing ligand
AR	Adenosinrezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
BAFF	engl. B cell activating factor
Bcl-6	engl. B-cell lymphoma 6
BTLA	B-und-T-Lymphozyten-Attenuator
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CCR6	engl. chemoattractant cytokine receptor 6
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CIA	engl. collagen induced arthritis
CTLA-4	zytotoxisches T-Lymphozytenantigen-4
Con A	Concanavalin A
COPD	engl. Chronic obstructive pulmonary disease (Chronisch obstruktive Lungenerkrankung)
CREB	engl. cyclic AMP response element binding protein
CRP	C-reaktives Protein
CXCL9 (= MIG)	engl. chemokine C-X-C motif ligand 9
CXCL10 (= IP-10)	engl. chemokine C-X-C motif ligand 10
CXCR	engl. C-X-C motif chemokine receptor
CYP	Cytochrom P450
DC	engl. dendritic cell
DAS-28	engl. disease activity score 28
DNA	engl. desoxyribonucleic acid
EFSA	engl. European Food Safety Authority
EULAR	engl. European League against Rheumatism
FcR	engl. fragment crystallisable receptor
FLS	engl. fibroblast-like synoviocytes

FOXP3	Forkhead Box P3
GI-Trakt	Gastrointestinal-Trakt
GPCR	engl. G-protein coupled receptors (deut. G-protein gekoppelter Rezeptor)
GWAS	engl. genome-wide association studies
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HWZ	Halbwertszeit
ICOS	engl. inducible costimulator
IFNGR	IFN- $\gamma$ -Rezeptor
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-17R	Interleukin-17-Rezeptor
IP-10 (= CXCL10)	engl. IFN- $\gamma$ -inducible protein 10
iT <sub>reg</sub>	induzierte regulatorische T Zellen
JAK-STAT	engl. Janus kinase-signal transducer and activator of transcription
MC	Morbus Crohn
MCPG	Meta-Carpo-Phalangealgelenk
METTL 3	Methyltransferase 3
MHC	engl. major histocompatibility complex
MIG (=CXCL9)	engl. Monokine induced by Interferon- $\gamma$
MMP	Matrix-Metalloprotease
MP	Morbus Parkinson
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
MTX	Methotrexat
NAT2	N-Acetyltransferase 2
NDE	neurodegenerative Erkrankungen
NF- $\kappa$ B	engl. nuclear factor kappa B
NK	Natürliche Killerzellen
NORA	new-onset RA
NSIP	Nicht-spezifische interstitielle Pneumonie
PAD	Peptidylarginin-Deiminase
PBMC	engl. peripheral-blood mononuclear cell
P. copri	Prevotella copri
PDE	Phosphodiesterase

PD-1	engl. programmed cell death protein 1
PD-L1	engl. programmed cell death ligand 1
PGIA	engl. proteoglycan-induced arthritis
PHA	Phytohämagglutinin
PIPG	Proximales Interphalangealgelenk
PKA	Proteinkinase A
PSA	Polysaccharid A
PTPN22	engl. protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22
RA	Rheumatoide Arthritis
RANKL	engl. receptor activator of nuclear factor kappa beta ligand
RF	Rheumafaktor
RNA	engl. ribonucleic acid
ROR $\gamma$ t	engl. RAR-related orphan receptor gamma t
ROS	engl. reactive oxygen species
SCFA	engl. Short Chain Fatty Acid
sDMARDs	engl. synthetic disease-modifying anti-rheumatic drugs
SF	Synovialflüssigkeit
SFB	Segmentierte Fadenbakterien
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SM	Synovialmembran
SNP	single-nucleotide Polymorphismus
Spp.	Spezies
T1DM	Diabetes mellitus Typ 1
T-bet	engl. T-box expressed in T cells
TCR	T-Zell-Rezeptor
Tfh	follikuläre Th Zellen
TGF $\beta$	engl. transforming growth factor beta
Th Zellen	T Helferzellen
TLR	Toll-like-Rezeptoren
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TNFR1	TNF Rezeptor 1
TRPC6	engl. transient receptor potential channel 6
T <sub>reg</sub>	Regulatorische T Zellen
UIP	Übliche interstitielle Pneumonie
XO	Xanthinoxidase

## 1. Zusammenfassung

Eine der weltweit häufigsten Autoimmunerkrankungen stellt die Rheumatoide Arthritis (RA) dar. Trotz neuer Forschungsmethoden bleibt ihre Pathogenese weiterhin unvollständig verstanden. Multiple endogene und exogene Faktoren spielen dabei eine entscheidende Rolle und beeinflussen sich wechselseitig. Nicht zuletzt haben auch Umweltfaktoren einen Einfluss auf die Krankheitsentstehung.

Unter den beeinflussbaren Risikofaktoren für eine RA spielen Tabakkonsum und Ernährung eine wichtige Rolle. In der Vergangenheit wurden mehrere Kohortenstudien durchgeführt mit teils widersprüchlichen Ergebnissen bezüglich des Einflusses von Kaffee und Koffein auf die RA. Um den Zusammenhang zwischen Koffein als einem Hauptwirkstoff von Kaffee und der RA auf zellulärer Ebene näher zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit CD4+ Zellen aus dem Blut von RA-Patienten isoliert und mit unterschiedlichen Koffeinkonzentrationen für 48 Stunden kultiviert. Anschließend wurde die Interferon-gamma-(IFN- $\gamma$ ) und die Interleukin-17-(IL-17) Produktion im Zellkulturmedium gemessen. Wir konnten für Koffeinkonzentrationen von 400  $\mu$ M und 4000  $\mu$ M einen erhöhten Anteil an IFN- $\gamma$  produzierenden CD4+ Zellen mittels Durchflusszytometrie beobachten. Dies lässt zum einen annehmen, dass Koffein einen direkten Einfluss auf T-Helferzellen vom Subtyp 1 (Th1-Zellen) hat. Zum anderen würde dies eine pro-inflammatorische Wirkungskomponente von Koffein annehmen lassen.

Um zu untersuchen, über welchen Rezeptor Koffein diese Wirkung vermittelt, wurden weitere Experimente durchgeführt, in denen die Expression des Adenosinrezeptors (AR) A2A auf CD4+ Zellen untersucht wurde. Im Vergleich zu gesunden Kontrollen fanden wir auf Th1-Zellen von RA-Patienten eine erhöhte Expression von A2A-AR. Die Wirkung von Koffein auf den Anteil IFN- $\gamma$  produzierender Zellen ließ sich mittels Adenosin aufheben.

Diese Arbeit zeigt, dass Koffein *in vitro* die IFN- $\gamma$ -Produktion von Th1-Zellen über den A2A-AR erhöht. Dies könnte ein Hinweis für eine pro-inflammatorische Wirkung von Koffein auf die RA sein.

## 2. Einleitung

Autoimmunerkrankungen spielen weltweit und im Besonderen in den westlichen Ländern eine wichtige Rolle.<sup>1</sup> Autoimmunität liegt der Verlust der Fähigkeit zugrunde, zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen zu unterscheiden. Körpereigenes wird als fremd erkannt, was zu Entzündungsvorgängen und schlussendlich Gewebeuntergang führt.<sup>1,2</sup> Zu den häufigsten Autoimmunerkrankungen gehören unter anderem die Hashimoto-Autoimmunthyreoiditis, Multiple Sklerose (MS), Diabetes mellitus Typ 1 (T1DM), chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) wie Morbus Crohn (MC) und die Rheumatoide Arthritis (RA).<sup>1,3</sup> In den letzten drei Jahrzehnten konnte eine deutliche Zunahme der Inzidenz und Prävalenz von Autoimmunerkrankungen verzeichnet werden.<sup>3</sup>

Gerade durch ihren zumeist chronischen Verlauf stellen Autoimmunerkrankungen eine große Herausforderung dar; einerseits für den einzelnen Patienten durch Einschränkungen in der Lebensqualität und physischen Funktionalität<sup>4</sup> und andererseits sozioökonomisch durch hohe medizinische Kosten.<sup>5</sup> Deshalb ist neben einer frühen Diagnosestellung und Einleitung einer entsprechenden Therapie das Erkennen von beeinflussbaren Risikofaktoren für die Vermeidung von Autoimmunerkrankungen und für einen günstigeren Verlauf entscheidend.<sup>5,6</sup>

### 2.1. Rheumatoide Arthritis

Die RA ist eine der weltweit häufigsten, chronisch-entzündlichen Autoimmunerkrankungen<sup>5,7</sup> und die häufigste entzündliche Arthropathie weltweit.<sup>8,9</sup> Sie ist unbehandelt durch einen progredienten, schubhaften Verlauf gekennzeichnet. In der westlichen Welt liegt die Prävalenz bei 0,5-1%.<sup>5,7,10-19</sup> mit einem Nord-Süd-Gefälle<sup>5</sup> und einer dreifach erhöhten Prävalenz bei Frauen im Vergleich zu Männern.<sup>11</sup> Damit stellt sie eine typische Autoimmunerkrankung mit typischer Prävalenz dar (zum Vergleich weltweite Prävalenzen von Autoimmunerkrankungen: SLE (0,4-3,6%),<sup>20</sup> CED (0,3-0,4 %),<sup>21</sup> MS (0,5-3%),<sup>22</sup> T1DM (9,5%)).<sup>23</sup> Prinzipiell ist eine Erkrankung in jedem Lebensalter möglich, jedoch steigt die Prävalenz mit zunehmendem Lebensalter und einer Manifestation ab 60 Jahren.<sup>19</sup>

#### 2.1.1. Klinik

Typischerweise äußert sich die RA durch eine symmetrische Polyarthritiden<sup>6,7,13-18</sup> insbesondere mit Befall der kleinen Gelenke wie der Metacarpophalangealgelenke (MCPGs) und der proximalen Interphalangealgelenke (PIPGs)<sup>8</sup> sowie eine Morgensteifigkeit mit einer Dauer von über 30 Minuten.<sup>24</sup> Zusätzlich können unspezifische Allgemeinsymptome entsprechend einer B-Symptomatik auftreten. Häufig bestehen außerdem extraartikuläre Organmanifestationen an Herz (Perikarditiden und Herzklappenveränderungen), Lunge<sup>15</sup> (vermehrtes Auftreten von chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) und interstitieller Lungenfibrose (NSIP/UIP))<sup>18</sup>, okulär (in Form einer Keratoconjunctivitis sicca) und an den Gefäßen (Vaskulitiden und vorzeitige Arteriosklerose).<sup>24</sup>

Die RA kann sehr variable Verläufe aufweisen<sup>10-13</sup> von Patienten mit einem stabilen Krankheitsverlauf unter Therapie bis hin zur vollständigen Destruktion und zum Funktionsverlust von Gelenken im Endstadium.<sup>25</sup> Klassisch ist ein schubartiger Verlauf mit Phasen der klinischen Remission gefolgt von Phasen der erneuten erhöhten Entzündungsaktivität mit geschwellenen, schmerzhaften Gelenken und deren konsekutiven Funktionseinschränkung.<sup>7,17</sup> Die Krankheitsaktivität kann unter anderem mit Hilfe des *disease activity scores 28* (DAS-28) evaluiert werden.<sup>5,24</sup>

### 2.1.2. Diagnostik

Es bestehen aktuell keine einheitlichen Diagnosekriterien für die RA. Die Diagnose wird anhand der Zusammenschau aus Anamnese, klinischer Untersuchung und laborchemischen und radiologischen Befunden gestellt<sup>5,24</sup> und ggf. durch weitere bildgebende Verfahren wie Gelenksonographie und MRT<sup>24</sup> ergänzt. Die aktuelle Krankheitsaktivität lässt sich an der Intensität der Beschwerden und anhand einer Erhöhung der unspezifischen Entzündungswerte wie CRP und BSG abschätzen.<sup>5,24</sup>

2010 wurden die 1978 vom American College of Rheumatology (ACR) erstellten Klassifikationskriterien durch die ACR und die European League against Rheumatism (EULAR) vollständig überarbeitet (Tabelle 1). Auch wenn es sich hierbei vorrangig um eine Klassifikation handelt und somit keine individuelle Diagnosestellung anhand der Kriterien möglich ist, bieten die Klassifikationskriterien dennoch eine Unterstützung in der Diagnosefindung.<sup>5</sup>

*Tabelle 1: ACR-/EULAR-Klassifikationskriterien 2010<sup>26</sup> zur Diagnosestellung einer RA. Ab  $\geq 6$  Punkten und einer gesicherten Synovialitis ohne andere erklärliche Ursache ist die Diagnosestellung möglich.*

<b>Schwellung oder Druckschmerzhaftigkeit der Gelenke</b>	
1 großes Gelenk	0 Punkte
2-10 große Gelenke	1 Punkte
1-3 kleine Gelenke	2 Punkte
4-10 kleine Gelenke	3 Punkte
> 10 Gelenke, davon mindestens 1 kleines Gelenk	5 Punkte
<b>Serologie</b>	
RF und CCP negativ	0 Punkte
RF und CCP niedrigtitrig positiv	2 Punkte
RF oder CCP hochtitrig positiv	3 Punkte
<b>Akute Phase Proteine</b>	
CRP und BSG normal	0 Punkte
CRP oder BSG erhöht	1 Punkte

Dauer der Beschwerden	
< 6 Wochen	0 Punkte
≥ 6 Wochen	1 Punkte

### (1) Rheumafaktor (RF) und Anti-Citrullinated Protein Antikörper (Anti-CCP-AK oder ACPA)

Laborchemische und molekulargenetische Veränderungen gehen der klinischen Manifestation der RA meist mehrere Jahre voraus.<sup>9</sup> RF und ACPA können dabei als Serummarker für die Diagnose einer seropositiven RA herangezogen werden. Ca. 1/3 aller Patienten ist jedoch seronegativ. Zudem kann der RF bei vielen rheumatischen Erkrankungen wie beispielsweise dem Sjögren's Syndrom oder bei bestimmten Kollagenosen erhöht sein, weshalb er als unspezifisch zu bewerten und eine RA bei Nicht-Vorhandensein des Marker nicht auszuschließen ist.<sup>5,6,8</sup>

Der RF ist ein in B-Zellen produziertes Immunglobulin des Typ G (IgG)<sup>9</sup> mit einer Sensitivität von 60-90% und einer Spezifität von 48-92%.<sup>6</sup> Er spielt eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Synovialitis durch Aktivierung des Komplementsystems und Erleichterung der Leukozyteninfiltration ins Gewebe. Eine Erhöhung geht einher mit einer schlechteren Prognose und ausgeprägterer Symptomschwere inklusive vermehrtem Auftreten von extraartikulären Manifestationen.<sup>6</sup> Der RF ist beteiligt an der Aktivierung von Gewebsmakrophagen intraartikulär und hat somit direkten Einfluss auf die Krankheitsentstehung und Aufrechterhaltung der Entzündung.<sup>5</sup>

Im Gegensatz zum RF sind ACPAs spezifisch für die RA. ACPAs konnten zu 80-90% im Serum aller RA-Patienten nachgewiesen werden<sup>9</sup> und ACPA-produzierende B-Zellen in der Synovialflüssigkeit. Diese befördern die Pathogenese der RA<sup>26</sup> möglicherweise direkt durch Makrophagen- oder Osteoklastenaktivierung.<sup>5</sup> Sie sind bereits Jahre vor der klinischen Manifestation der RA nachweisbar und steigen im Titer bis zum Krankheitsbeginn kontinuierlich an.<sup>9,27</sup>

Citrullinierung oder auch Deiminierung von Proteinen ist ein physiologischer Prozess, bei dem durch die Peptidylarginin-Deiminase (PAD) Ca<sup>2+</sup>-abhängig Arginin zu Citrullin umgewandelt wird.<sup>6,28</sup> Dieser Prozess tritt vermehrt bei entzündlichen Vorgängen im Körper auf.<sup>9</sup> Unter physiologischen Bedingungen besteht keine Autoreaktivität gegen citrullinierte Proteine.<sup>6,28</sup> In Autoimmunerkrankungen und insbesondere bei der RA konnten erhöhte Werte der PAD-Isoformen 2 und 4 mit Hyperaktivität im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen werden, wodurch eine potentielle Rolle des Citrullinationsprozesses für die Entwicklung von Autoimmunität angenommen werden kann.<sup>26,28</sup> Citrullinierte Proteine führen bei Autoimmunerkrankungen in B-Zellen zu einer Produktion und Sekretion von ACPA, wahrscheinlich gefördert durch T-Helferzell-Aktivität.<sup>5</sup>

### 2.1.3. Therapie

Als chronisch-entzündliche Erkrankung mit Gelenkdestruktion und Funktionsverlust bei Fortschreiten der Erkrankung ist das oberste Therapieziel die Eindämmung der Entzündungsaktivität. Die zunehmende Arthropathie ist letztlich Folge der persistierenden Entzündung, weshalb eine antiinflammatorische Therapie oberste Priorität haben sollte.<sup>5,29</sup>

Als Standardmedikament in der Therapie der RA wird Methotrexat (MTX) eingesetzt, ein Wirkstoff aus der Gruppe der synthetischen Disease-modifying anti-rheumatic drugs (sDMARDs). Zu Therapiebeginn wird MTX meist in Kombination mit niedrig-dosierten Glucocorticoiden verabreicht.<sup>5,25</sup> Diese sollten aufgrund ihrer Langzeitnebenwirkungen wie einem erhöhten Risiko für Infektionen und kardiovaskuläre Erkrankungen,<sup>30</sup> Gewichtszunahme, Pergamenthaut, Muskelatrophie, Hirsutismus oder ihrer diabetogenen Wirkung,<sup>31</sup> Osteoporose,<sup>30,31</sup> und Unterdrückung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse<sup>31</sup> nur kurzfristig und nur bei nicht anders zu beherrschender Krankheitsaktivität angewandt und im Verlauf möglichst innerhalb von drei Monaten ausgeschlichen<sup>5</sup> bzw. unter die Cushing-Schwelle von 30 mg Hydrocortison bzw. 7,5 mg Prednisolon<sup>24</sup> gesenkt werden.

In den letzten Jahren wurden vermehrt zielgerichtete Therapien entwickelt, die ihre Wirksamkeit vor allem bei Patienten mit erhöhtem Risikoprofil oder bei unzureichendem Ansprechen auf die Initialtherapie bewiesen haben. Dazu gehören unter anderem Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) -Inhibitoren (Infliximab, Adalimumab, Etanercept etc.), Interleukin 6 (IL-6) -Rezeptorblocker (Tocilizumab), T-Zell-Costimulations-Inhibitoren (Abatacept) und B-Zell-Antikörper (Rituximab). In seltenen Fällen können einzelne Patienten möglicherweise von einer Therapie mit Interleukin-1 (IL-1) -Inhibitoren profitieren.<sup>5</sup>

Eine weitere wichtige Säule für die Lebensqualität der Patienten stellt die symptomatische Behandlung mit Schmerzmitteln dar, die jedoch ausschließlich als supportiv anzusehen ist, da sie keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf als solchen hat.<sup>5</sup>

### 2.1.4. Pathogenese von RA

Der Krankheitsverlauf<sup>9</sup> der RA hat sich durch die Fortschritte in den Therapiemöglichkeiten in den letzten Jahren deutlich verbessert.<sup>7,29,32</sup> Dennoch bleibt trotz intensiver Forschung mittels neuer Techniken wie genomweiter Sequenzierung die Pathogenese der RA weiterhin unvollständig verstanden. Es wird heutzutage von einem Syndrom mit multifaktorieller Genese ausgegangen.<sup>9</sup> Dabei beeinflussen sich genetische, epigenetische und äußere Faktoren wie Lebensgewohnheiten und Umwelteinflüsse wechselseitig<sup>6</sup> und kreieren dadurch ein komplexes, heterogenes Netzwerk, in dem sich auf variablem Weg ein sich klinisch ähnlich präsentierender Phänotyp entwickeln kann.<sup>6,14</sup>

## **(1) Genetische Prädisposition, epigenetische und posttranslationale Modifikationen**

In den letzten Jahren konnten durch moderne Gendiagnostik u.a. mittels genome-wide association studies (GWAS)<sup>6,15</sup> über 100 verschiedene Genloci identifiziert werden, die mit einer erhöhten Suszeptibilität für die RA einhergehen.<sup>5,6,9,32</sup> Es wird davon ausgegangen, dass die genetische Prädisposition mit ca. 40-60% zur Erkrankungswahrscheinlichkeit an der RA beiträgt.<sup>6,9</sup>

Die wichtigsten genetischen Veränderungen sind vor allem Polymorphismen in den Humanen Leukozytenantigen (HLA) -Genen<sup>6,15</sup>, insbesondere in den Genloci HLA-DRB1<sup>5,6,15,32</sup> und HLA-DRB4.<sup>5,9,32</sup> Diese gemeinsamen Aminosäuresequenzen werden als sogenanntes Suszeptibilitätsepitop bezeichnet<sup>9</sup> und sind mit einer erhöhter Krankheitsaktivität und dem vermehrten Auftreten von extraartikulären Manifestationen vergesellschaftet.<sup>8,9</sup> HLA-DRB1 weist in diesem Zusammenhang zusätzlich eine Assoziation mit Seropositivität für ACPA und RF auf.<sup>5,6,15</sup>

Neben dem Suszeptibilitätsepitop konnten viele weitere single-nucleotid Polymorphismen (SNPs) in den Genen für die B- und T-Zellregulation und -funktion nachgewiesen werden, die mit erhöhter Erkrankungswahrscheinlichkeit für die RA assoziiert sind, so z.B. in der codierenden Regionen für die Protein Tyrosin Phosphatase non-receptor type 22 (PTPN22)<sup>6,32</sup> zuständig für die T-Zell-Rezeptor (TCR) vermittelte Immunantwort.<sup>9</sup>

Auch wurden genetische Polymorphismen in Zytokinen und Zytokinrezeptoren gefunden, die mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der RA assoziiert sind.<sup>9</sup> Non-HLA Suszeptibilitätsgene für Zytokine wie TNF- $\alpha$ <sup>9</sup>, IL-6<sup>9,15,32</sup> und IL-1 sind an der Aktivierung des angeborenen und erworbenen Immunsystems beteiligt und spielen in der Krankheitsentstehung der RA eine entscheidende Rolle.<sup>15</sup>

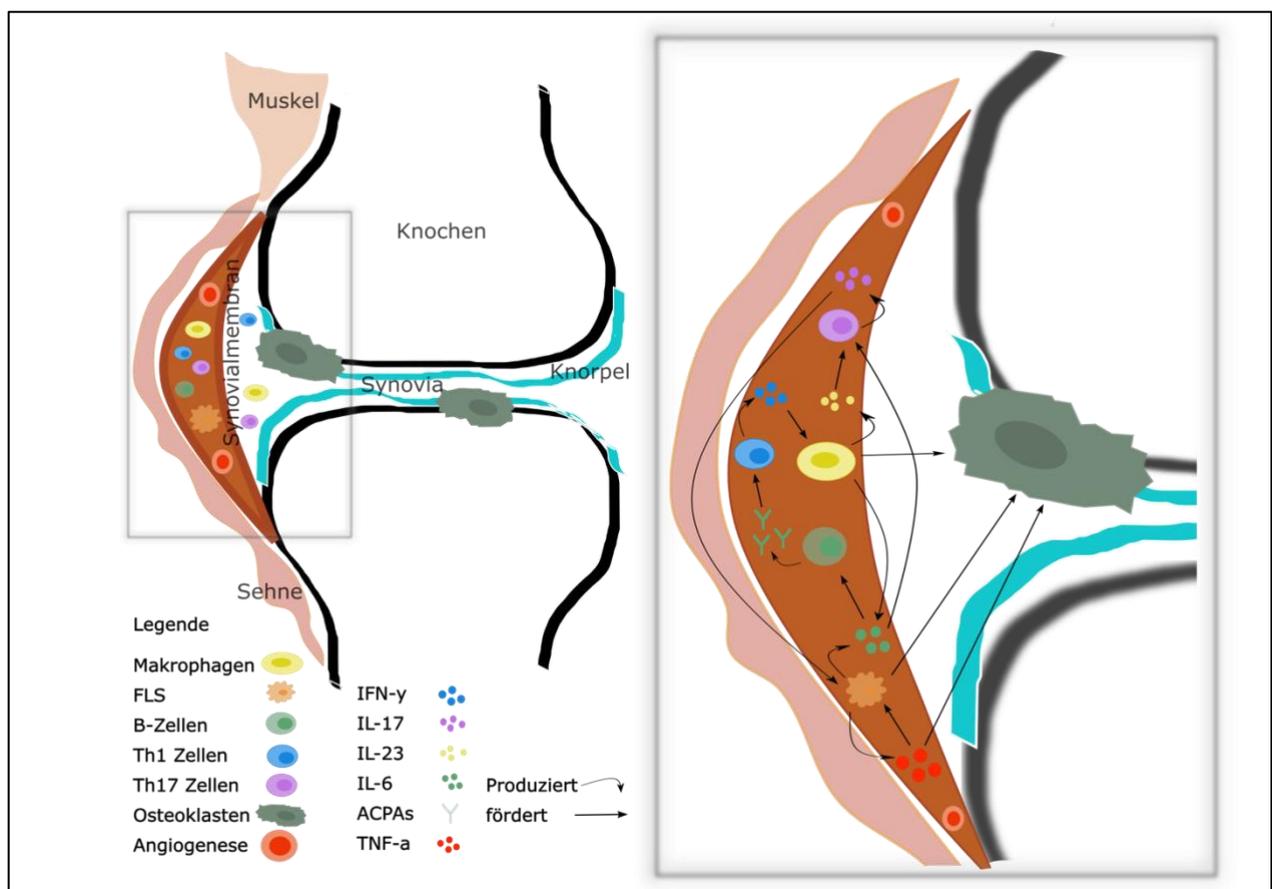
Zusätzlich zu einer genetisch bedingten Prädisposition scheinen epigenetische Modifikationen<sup>9</sup> und posttranslationale Modifikationen<sup>5,32</sup> eine Rolle für das Erkrankungsrisiko zu spielen. Unklar ist jedoch, inwieweit die epigenetischen Veränderungen für die Entstehung von der RA zuständig sind oder vielleicht sogar erst durch die Erkrankung verursacht werden.<sup>9</sup>

## **(2) Zelluläre Hauptakteure in der Pathogenese von RA**

Die Pathogenese der RA findet zum großen Teil intraartikulär statt.<sup>6,17</sup> Dies spiegelt sich in der klinischen Manifestation der RA wider, die durch chronische Synovitis, Gelenkdestruktion und damit einhergehenden Beschwerden charakterisiert wird. Die schmerzhaft geschwollenen Gelenke finden ihr zelluläres Korrelat in der Infiltration der Synovia durch Leukozyten sowohl des angeborenen (Makrophagen, Dendritische Zellen (DC), Mastzellen) als auch des erworbenen Immunsystems (B- und Plasmazellen, verschiedene Subtypen von CD4+ T-Helferzellen).<sup>5,7,9,25</sup> Als Grundlage wird eine T-Zell-vermittelte, gestörte immunologische Selbsttoleranz angenommen, die die Autoantikörperproduktion durch

aktivierte B-Zellen bzw. Plasmazellen befördert.<sup>18</sup> Durch direkte Zell-Zell-Kontakte einerseits und die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen andererseits wird die artikulare Entzündung aufrechterhalten und die Gelenkzerstörung durch Aktivierung von Osteoklasten vorangetrieben.<sup>5,7,9,15</sup> Auch eine Infiltration der Synovialmembran (SM) mit aktivierten Synovialfibroblasten und eine Neovaskularisation sind zu beobachten, wenn die Erkrankung klinisch apparent wird.<sup>9</sup> Eine Übersicht über die zellulären Hauptakteure sowie die von ihnen produzierten Zytokine findet sich in Abbildung 1.

Abbildung 1: Übersicht über die Interaktionen der zellulären Hauptakteure und ihrer produzierten Zytokine in den Gelenken von RA-Patienten.



### (a) Synovialfibroblasten

Synovialfibroblasten als gewebständige Zellen sind physiologisch an der Ernährung und durch Bildung unter anderem von Hyaluronsäure an der Aufrechterhaltung der Gelenkfunktion beteiligt.<sup>33</sup>

In RA-Patienten konnte 1996 ein veränderter, aggressiver Phänotyp von Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten (FLS)<sup>33</sup> in der Synovia bereits vor klinischer Manifestation der Erkrankung nachgewiesen werden.<sup>9,33</sup> Der genaue Prozess hinter der Aktivierung von Synovialfibroblasten zu FLS ist bisher nicht genau bekannt.<sup>9</sup> Man geht davon aus, dass unter

anderem epigenetische Modifikationen zur dauerhaften Aktivierung dieser Zellen beitragen könnten.<sup>32</sup> So konnten beispielsweise veränderte Methylierungsmuster von FLS-Genen nachgewiesen werden.<sup>5,6,9</sup> Zusätzlich scheinen verschiedene proinflammatorische Mediatoren zur Aktivierung beizutragen, darunter TNF- $\alpha$ , IL-34<sup>15</sup> oder IL-17.<sup>33</sup> Die Kombination von TNF- $\alpha$  und IL-17A und F bewirkt eine Stimulation von FLS zur Produktion von IL-6.<sup>34</sup>

Das Vorkommen von FLS kann sich zwischen Gelenken unterscheiden. So kann beispielsweise der aggressive Subtyp in Hüftgelenken vorliegen, während die Synovialfibroblasten im Kniegelenk unverändert sind.<sup>9</sup> FLS besitzen grundsätzlich die Fähigkeit zur Migration<sup>8</sup> und entwickeln eine Resistenz gegenüber Apoptoseinduktion.<sup>6,32</sup>

In der Pathogenese der RA nehmen sie eine zentrale Rolle ein zum einen in der Aufrechterhaltung der Inflammation durch die von ihnen produzierten proinflammatorischen Mediatoren,<sup>6,9,15,33</sup> vor allem durch das RA-charakterisierende IL-6,<sup>31,32</sup> und zum anderen durch eine aktive Rolle in der Gelenkdestruktion.<sup>6,32</sup> Zytokine wie IL-6, IL-17A und TNF- $\alpha$ <sup>6,9,15,33</sup> wirken chemotaktisch auf Immunzellen, darunter auch CD4+ T-Zellen,<sup>9,33</sup> und IL-6<sup>9</sup> und TNF- $\alpha$ <sup>15</sup> bewirken eine Aktivierung von Antikörper-produzierenden B-Zellen. Weiterhin produzieren FLS Matrix-Metalloproteasen (MMPs), die für den Abbau von Kollagen-II-Netzwerken<sup>35</sup> und somit die Zerstörung des Gelenkknorpels<sup>36</sup> durch katabol wirksame Chondrozyten<sup>5</sup> zuständig sind. Die Gelenkdestruktion erfolgt zum einen aktiv durch die Invasion des Gelenkknorpels durch FLS<sup>15</sup> und Pannusformation<sup>35</sup> und andererseits durch die RANKL-vermittelte Stimulation der Osteoklastendifferenzierung und -aktivierung.<sup>5</sup>

### **(b) Makrophagen**

Neben FLS sind Makrophagen ein Treiber in der Entstehung der RA. Makrophagen als ein wichtiger zellulärer Vertreter des angeborenen Immunsystems differenzieren sich gewebespezifisch aus peripheren mononuklearen Blutzellen (PBMCs) und können über unterschiedliche Wege aktiviert werden.<sup>37</sup> Der klassische Aktivierungsweg erfolgt dabei IFN- $\gamma$  vermittelt, welches größtenteils durch Th1-Zellen sezerniert wird. IFN- $\gamma$ -Einfluss bewirkt eine Aktivierung und Differenzierung zu Makrophagen mit anti-mikrobieller Aktivität.<sup>37</sup> Klassisch aktivierte Makrophagen sind charakterisiert durch ein proinflammatorisches Zytokinprofil bestehend aus IL-1, IL-6 und Interleukin-23 (IL-23).<sup>9,37</sup>

In RA-Patienten unterstützen Makrophagen somit zum einen die Differenzierung von Th-Zellen zum Th17-Subtyp<sup>37</sup> und die Aktivierung von Synovialfibroblasten zu FLS. Zum anderen können sie direkt zur Gelenkzerstörung beitragen, indem sie sich zu Osteoklasten differenzieren. Osteoklasten als gewebeständige spezialisierte Makrophagen können unter anderem durch ACPAs und proinflammatorische Zytokine (IL-1, IL-6 oder TNF- $\alpha$ ) im Sinne eines sich selbst verstärkenden Feedback-Mechanismus aktiviert werden.<sup>32</sup>

In der Synovia von RA-Patienten und Patienten mit erhöhtem Risiko konnten atypische Monozyten (CD14<sup>-/+</sup>, CD16<sup>++</sup>) nachgewiesen werden, was ein Hinweis auf die Beteiligung an

der Pathogenese der RA dieses gewebsinvasiven und proinflammatorischen Phänotyps sein könnte.<sup>38,39</sup> *In vitro* ist dieser Monozyten-Subtyp in der Lage, die Differenzierung und Expansion von Th17-Zellen zu befördern.<sup>40</sup>

### **(c) Neutrophile Granulozyten und Dendritische Zellen (DCs)**

Weitere zelluläre Akteure, die das Entzündungsgeschehen articular unterhalten, sind Neutrophile Granulozyten und DCs. In der Synovia von RA-Patienten konnten aktivierte Neutrophile mit verändertem Phänotyp nachgewiesen werden. Dieser zeichnet sich durch eine erhöhte Chemokinexpression, die vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies<sup>15</sup> (ROS) und die Produktion von proteolytisch wirksamen Enzymen<sup>8</sup> aus.

DCs sind ebenfalls an der Produktion von proinflammatorischen Mediatoren beteiligt. Zudem unterstützen sie die Leukozyteninfiltration in die Synovia und präsentieren als antigenpräsentierende Zellen Autoantigene für autoreaktive T-Lymphozyten<sup>15</sup> über MHC II Moleküle.<sup>5</sup>

### **(d) B-Zellen**

B-Zellen und Plasmazellen sind reichlich vorhanden in der Synovialmembran von RA-Patienten.<sup>6,32,41</sup> Ihre Rolle in der Pathogenese wird zum einen durch die Assoziation zwischen verminderten B-Zellzahlen und einer dauerhaft niedrigeren Krankheitsaktivität und zum anderen durch den häufigen Nachweis von Antikörpern wie RF und ACPAs verdeutlicht.<sup>9,32</sup>

Um die Fähigkeit zur Autoantikörperproduktion zu entwickeln, sind B-Zellen auf die Co-Stimulation durch Th-Zellen angewiesen<sup>17,32</sup> und müssen zunächst einen Reifungsprozess in Lymphfollikeln durchlaufen.<sup>32</sup> In diesen Lymphfollikeln konnte in RA-Patienten articular der Subtyp von folliculären Th(Tfh)-Zellen nachgewiesen werden, der somit einen möglichen Hinweis auf die Funktion dieses Zelltypen in der Pathogenese der RA erahnen lässt.<sup>17</sup>

Die Stimulation zur Ausreifung von Autoantikörper-produzierenden B-Zellen erfolgt unter anderem durch den Einfluss von IL-6, B cell activating factor (BAFF) und a proliferating inducing ligand (APRIL).<sup>9</sup> IL-6 als RA typisches Zytokin wird dabei im Gelenk zum Großteil von aktivierten Synovialfibroblasten gebildet<sup>41</sup>, wodurch das komplexe, sich wechselseitig beeinflussende Netzwerk von Akteuren in der Pathogenese der RA weiter verdeutlicht wird.

Neben der Antikörperproduktion und dadurch einen Beitrag an der Entwicklung der humoralen Autoimmunität, besitzen B-Zellen außerdem die Fähigkeit zur Antigenpräsentation und Zytokinproduktion.<sup>9,32,41</sup> Durch ihre sezernierten Zytokine erleichtern sie unter anderem die Leukozyteninfiltration ins Gewebe<sup>15</sup>, die Proliferation von CD4+ Th-Zellen und die Differenzierung zum Th1-Subtyp, assoziiert mit einem Zytokinprofil reich an C-X-C motif ligand (CXCL) 10, IL-2, IL-6 und IFN- $\gamma$ .<sup>41</sup> Dadurch unterstützen sie eine sich selbstunterhaltene Feedback-Schleife<sup>41</sup>, da diese aktivierten Th1-Zellen wiederum zur Stimulation von

proinflammatorischen B-Zellen beitragen.<sup>6,42</sup> Weiterhin sind auch Makrophagen an der Aktivierung von B-Zellen beteiligt.<sup>15</sup>

Die aktivierten B-Zellen produzieren außerdem IFN- $\gamma$  vermittelt<sup>43,44</sup> Chemokine wie CXCL 9 und 10 (entspricht monokine induced by IFN- $\gamma$  (MIG) bzw. IFN- $\gamma$ -inducible protein 10 (IP-10)), die beide die Leukozytenmigration, insbesondere die von CD4+ T-Zellen, an den Ort der Entzündung erleichtern und somit im Sinne eines Circulus vitiosus zur Aufrechterhaltung und zum Fortschreiten der Inflammation führen.<sup>42,43</sup> Erhöhte MIG-Level konnten bei RA-Patienten sowohl im Serum<sup>45</sup> als auch in der Synovialflüssigkeit (SF)<sup>46</sup> und in der Synovia<sup>43</sup> selbst nachgewiesen werden. In einer Studie von *Kuan et al.* korrelierten erhöhte MIG-Level positiv mit der Krankheitsaktivität von Rheumapatienten bewertet anhand der EULAR Klassifikation.<sup>45</sup>

CXCL10 vermittelt seine aktivierende Wirkung auf Th1-Zellen über den Chemokinrezeptor C-X-C motif chemokine receptor (CXCR) 3. In Zusammenspiel mit TNF- $\alpha$  unterhält es das Entzündungsgeschehen und treibt RANKL-vermittelt die Osteoklastendifferenzierung und folglich die Gelenkzerstörung voran. Somit sind B-Zellen ein wichtiger Co-Stimulator zur Beförderung der Gelenkdestruktion.<sup>15</sup> Neben B-Zellen wird IP-10 weiterhin durch Monozyten, DCs, Endothelzellen, Neutrophile und Synovialfibroblasten produziert.<sup>43</sup>

### **(e) Th1-Zellen und IFN- $\gamma$**

In der Pathogenese der RA spielen CD4+ Th-Zellen eine entscheidende Rolle.<sup>6,7,47</sup> Naive Th-Zellen differenzieren sich durch Antigenkontakt und bestimmte Zytokinmuster zu unterschiedlichen Subtypen.<sup>29</sup> In Studien zur Immunpathogenese von RA konnten vor allem Th1- und Th17-Zellen als Hauptakteure nachgewiesen werden.<sup>4,29,48</sup>

1986 wurden Th-Zellen von *Mosmann und Coffman* im Mausmodell anhand ihrer sezernierten Zytokinprofile erstmalig in IFN- $\gamma$ , IL-2 und TNF produzierende Th1-Zellen und in IL-4 und IL-5 produzierende Th2-Zellen unterteilt.<sup>49</sup> Fünf Jahre später erbrachten *Romagnani et al.* diesen Nachweis von Th-Zell-Subtypen erstmals auch im Menschen.<sup>50</sup>

Sowohl in der SF als auch in der SM von RA-Patienten konnte eine vermehrte Anzahl von Th1-Zellen bzw. ein für Th1-Zellen charakteristisches, proinflammatorisches Zytokinmilieu (IFN- $\gamma$ , IL-2<sup>50,51</sup> und TNF<sup>38</sup>) beobachtet werden.<sup>51,52</sup> *Simon et al.* konnten in ihrer cross-sectional Studie in einer Subgruppe von RA-Patienten nachweisen, dass ein Th1 typisches Zytokinmuster mit einer schwereren Krankheitsaktivität und erhöhten Antikörper-Titern einher geht.<sup>41</sup> Außerdem konnten gerade in frühen RA-Krankheitsstadien erhöhte zirkulierende Citrullin-spezifische Th1-Zellzahlen nachgewiesen werden.<sup>53</sup>

Th1-Zellen sind neben ihren charakteristisch produzierten und sezernierten Zytokinen durch den CXCR3 als Oberflächenmarker<sup>54</sup> und ihren Master-Transkriptionsfaktor T-bet<sup>55</sup> gekennzeichnet. Die Differenzierung zum Th1-Subtyp erfolgt unter anderem durch den

Einfluss von IL-12 und IFN- $\gamma$ .<sup>35</sup> Somit sind Th1-Zellen im Sinne eines sich selbstverstärkenden positiven Feedbacks mit an der Aktivierung von weiteren Th1-Zellen beteiligt.<sup>44</sup>

In der Pathogenese der RA tragen Th1-Zellen durch die Produktion von TNF- $\alpha$  zur Osteoklastogenese und damit entscheidend zum Knochenabbau und der konsekutiven Gelenkdestruktion bei.<sup>6,17,30</sup> Die TNF Wirkung wird dabei zum einen direkt über den TNF-Rezeptor 1 (TNFR1)<sup>35</sup> und zum anderen über den receptor activator of nuclear factor kappa beta ligand (RANKL)<sup>5,35</sup> vermittelt.

Eine weitere wichtige Funktion erfüllen Th1-Zellen in der Aktivierung und Stimulation von B-Zellen.<sup>6,15,42</sup>

Neben der Aktivierung von Osteoklasten und B-Zellen spielen Th1-Zellen vor allem durch ihre IFN- $\gamma$  Produktion eine wichtige Rolle in der Pathogenese der RA. IFN- $\gamma$  gehört zur Familie der Interferone und stellt den einzigen Vertreter der Typ II Interferone dar.<sup>56</sup> Physiologisch erfüllt IFN- $\gamma$  als wichtiger Immunmodulator eine Reihe von unterschiedlichen Funktionen in der Abwehr von Pathogenen. So spielt es eine entscheidende Rolle in der antimikrobiellen und antiviralen Immunantwort<sup>35,57,58</sup> beispielsweise in der Bekämpfung von Mykobakterium tuberculosis oder Herpes Zoster Infektionen.<sup>58</sup>

Die Hauptproduzenten von IFN- $\gamma$  sind Th1-Zellen,<sup>17,56,58</sup> die sich gerade dadurch von anderen Subtypen von CD4+ T-Zellen abgrenzen lassen.<sup>56</sup> In geringerem Ausmaß tragen auch Makrophagen, DCs, natürliche Killer (NK) Zellen und B-Zellen zur IFN- $\gamma$  Produktion bei.<sup>56,58</sup>

Die Wirkung von IFN- $\gamma$  wird über die IFN- $\gamma$  Oberflächenrezeptoren (IFNGR-1 und -2) initiiert und über den Janus kinase-signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT-) Signalweg vermittelt.<sup>58</sup> Es wurden bereits mehrere 100 IFN- $\gamma$  modulierte Gene beschrieben, wodurch die diversen und komplexen Funktionen des Interferons verdeutlicht werden.<sup>56</sup> Diese Komplexität wird durch eine große Überlappung in den Effektorgenen mit Typ I Interferonen wie IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\omega$  und - $\tau$ <sup>59</sup> weiter verkompliziert. So ist es häufig nicht möglich, einem beobachteten Effekt ein Interferon eindeutig zuzuordnen zu können.<sup>56</sup>

Eine Überexpression von IFN- $\gamma$  resultiert in erhöhtem Entzündungsgeschehen, Gewebeschäden und Nekrosen.<sup>58</sup> Aufgrund des breiten Spektrums an Funktionen und der komplexen Einbettung in das Zytokinnetzwerk des angeborenen und erworbenen Immunsystems wird IFN- $\gamma$  eine wichtige Rolle in der Pathogenese von systemischen Autoimmunerkrankungen wie unter anderem der RA zugeschrieben.<sup>41,56,58</sup> Erhöhte IFN- $\gamma$  Spiegel erleichtern die zelluläre Kommunikation des erworbenen Immunsystems und die bereits erwähnte Differenzierung von naiven Th-Zellen durch Co-Stimulation zum Th1-Subtyp und Tfh-Zellen.<sup>56,57</sup> Weiterhin bewirkt IFN- $\gamma$  einen Antikörperklassenwechsel zum Typ IgG in aktivierten B-Zellen,<sup>17,56,58</sup> was bei RA letztlich mit zur Chronifizierung des Entzündungsgeschehens beiträgt.<sup>6</sup> IFN- $\gamma$  erleichtert die Leukozytenmigration,<sup>17</sup>

Antigenprozessierung und -präsentation<sup>57</sup> und fördert sowohl Phagozytose als auch Autophagie durch Aktivierung von Makrophagen<sup>56,58</sup> und könnte somit zur Pathogenese von Autoimmunität und gestörter Selbsttoleranz bei der RA beitragen. So konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass IFN- $\gamma$  im Zusammenspiel mit CXCL10 zu einer Akkumulation von Tfh-Zellen und einer Autoantikörperproduktion durch B-Zellen in Patienten mit Autoimmunerkrankungen führt.<sup>41</sup>

Die Rolle von IFN- $\gamma$  für die Pathogenese der RA liefert derzeit uneindeutige Ergebnisse und ist nicht als alleiniger Faktor für die Entstehung der RA anzunehmen. Auf Basis der Annahme, RA sei eine Th1 gesteuerte Erkrankung, wurden in der Vergangenheit Studien mit IFN- $\gamma$ -Therapien in der Hoffnung durchgeführt, neue Therapieansätze für RA-Patienten zu finden. Für diese konnte jedoch in Phase II Studien keine Verbesserung von Symptomen nachgewiesen werden.<sup>16,17</sup>

Im Collagen induced arthritis (CIA) Mausmodell der RA kam es in IFN- $\gamma$ -defizienten Mäusen zu einer Exazerbation der arthritischen Beschwerden.<sup>7</sup> Ähnliche Ergebnisse werden von *Niu et al.* beschrieben. Sie konnten nachweisen, dass IFN- $\gamma$  antiinflammatorische Effekte im Arthritis-Modell vermittelte. In gesunden Mäusen begünstigte IFN- $\gamma$  jedoch Arthritischübe.<sup>16</sup>

Im RA PGIA-Mausmodell erwies sich IFN- $\gamma$  ebenfalls als Treiber der Pathogenese. In IFN- $\gamma$ -defizienten Mäusen bzw. Mäusen, die mit IFN- $\gamma$ -Antikörpern behandelt wurden, konnte eine Verbesserung der Symptome beobachtet werden. Gleichzeitig war in diesen Mäusen die IL-17 Produktion erhöht, was den suppressiven Effekt von IFN- $\gamma$  auf Th17-Differenzierung belegt. In der gleichen Studie konnte bei Doppel-Knockout-Mäusen eine deutliche Verbesserung der arthritischen Beschwerden nachgewiesen werden.<sup>7</sup>

#### **(f) Th17-Zellen, IL-17 und T<sub>reg</sub>-Zellen**

Lange Zeit galt die RA aufgrund des typischen Zytokinprofils als eine primär Th1-Zell gesteuerte Erkrankung,<sup>7,16</sup> bis 1995 erstmalig IL-17 als neues murines Zytokin mit seinem entsprechenden Rezeptor (IL-17R) durch Yao Z. und Mitarbeiter beschrieben wurde.<sup>60</sup> IL-17 bewirkt als proinflammatorisches Zytokin nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) vermittelt<sup>7,60</sup> die Sekretion von weiteren Entzündungsmediatoren wie TNF- $\alpha$ <sup>35</sup>, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und MMPs in Synovialfibroblasten,<sup>16,17,48,60</sup> Makrophagen und Chondrozyten<sup>35</sup> und erleichtert die Co-Stimulation von T-Lymphozyten.<sup>60</sup> Zusätzlich werden Neutrophile Granulozyten rekrutiert.<sup>17</sup> Physiologisch ist die IL-17 Familie, bestehend aus den sechs Untertypen IL-17A-F, an der Abwehr von extrazellulären Bakterien und Pilzen beteiligt.<sup>17,18,48</sup>

Als Hauptproduzenten von IL-17, und dabei vor allem von IL-17A, erwiesen sich Th17 Lymphozyten,<sup>51</sup> deren Entdeckung das von *Mosmann et al.* postulierte Modell der Th1/Th2 Subtypisierung in Frage stellte.<sup>17</sup> In geringerem Maße tragen auch Makrophagen und Mastzellen zur Produktion von IL-17 bei.<sup>18</sup>

Th17-Zellen sind durch die Expression ihres Transkriptionsfaktors RAR-related orphan receptor gamma t (ROR $\gamma$ t),<sup>17,18,35</sup> der Oberflächenrezeptoren chemoattractant cytokine receptor (CCR) 6<sup>7,17</sup> und CXCR3<sup>48</sup> und die Produktion und Sekretion von IL-17,<sup>7,48</sup> IL-10, IL-22, IL-21<sup>35</sup> und zu geringeren Anteilen IFN- $\gamma$ <sup>48</sup> charakterisiert.

Die Differenzierung von naiven Th-Zellen zum Th17-Subtyp erfolgt angeregt durch ein Zytokinmilieu reich an IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-21, IL-23 und transforming growth factor beta (TGF $\beta$ )<sup>6,7,18,35,37</sup> über den JAK-STAT3-Weg.<sup>15</sup>

Als Gegenspieler zu Th17-Zellen sind regulatorische T(T<sub>reg</sub>) -Lymphozyten für die Immunhomöostase des Körpers zuständig und kontrollieren Entzündungsvorgänge durch die Sekretion von anti-inflammatorischen Zytokinen wie TGF- $\beta$ 1.<sup>16,35</sup> So sind sie unter anderem an der Verhinderung von Autoimmunerkrankungen beteiligt<sup>17</sup> entweder direkt durch Zell-Zell-Kontakte oder durch Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen.<sup>18</sup>

Molekular lassen sich T<sub>reg</sub>-Zellen durch ihren Transkriptionsfaktor Forkhead Box P3 (FOXP3)<sup>18</sup> und ihren Oberflächenrezeptor, das zytotoxische T-Lymphozytenantigen-4 (CTLA-4)<sup>17</sup> charakterisieren. Interessanterweise erfolgt die Differenzierung von naiven T-Zellen hin zum regulatorischen Typ neben dem Einfluss von IL-2 ebenfalls durch TGF- $\beta$ , welches auch in der Differenzierung von Th17-Zellen eine Rolle spielt. So scheint es abhängig vom vorherrschenden Zytokinmilieu zu sein, ob ein proinflammatorisch (Th17) oder anti-inflammatorisch (T<sub>reg</sub>) wirkender Subtyp favorisiert wird.<sup>17</sup>

In der Pathogenese der RA wird eine Dysbalance in der Th17/T<sub>reg</sub>-Zellratio als mitentscheidend angenommen.<sup>15,16</sup> Sowohl im Serum<sup>6,7,18</sup> als auch in der SF von RA-Patienten konnten erhöhte Th17-Zellzahlen bzw. IL-17 Werte nachgewiesen werden,<sup>16-18,48</sup> während die Anzahl von zirkulierenden T<sub>reg</sub>-Zellen im Serum vermindert<sup>16,18,35</sup> und in der SF und in der Synovialmembran zwar zum Teil erhöht,<sup>18</sup> aber scheinbar funktionslos bzw. dysfunktional war.<sup>15,35,61,62</sup> Diese Dysfunktion könnte durch den Überschuss von TNF im proinflammatorischen Milieu der Synovitis erklärt werden. *Valencia et al.* beschreiben in ihrer Studie, dass die Funktion von T<sub>reg</sub>-Zellen durch TNF inhibiert werden kann.<sup>63</sup>

Dass ein typisches, proinflammatorisches Th17-Zytokinmuster (IL-17, IL-23, IL-6 und TNF- $\alpha$ ) im Serum von RA-Patienten vorliegt, wurde auch in der Studie von *Niu et al.* nachgewiesen.<sup>16</sup> Die Erhöhung der Th17-Zellzahl und respektive die erhöhten IL-17 Werte vor allem in SF und SM korrelieren dabei mit einer erhöhten RA-Krankheitsaktivität.<sup>7,18,35,48</sup>

IL-17 bewirkt in der RA zum einen die Aufrechterhaltung der artikularen Entzündung durch Sezernierung von weiteren proinflammatorischen Mediatoren.<sup>35,48</sup>

Dabei ist die proinflammatorische Wirkung jedoch nicht einzig IL-17 zuzuschreiben, sondern vielmehr ist von einem synergistischen Effekt im Zusammenspiel mit anderen proinflammatorischen Zytokinen wie TNF, IL-1 oder auch IFN- $\gamma$  auszugehen.<sup>35</sup> So verstärkt beispielsweise TNF- $\alpha$  die IL-17 vermittelte Stimulation von Synovialfibroblasten.<sup>7</sup>

Zum anderen bewirkt IL-17 eine erhöhte Pannusformation<sup>18</sup> und Knochenresorption und trägt damit maßgeblich zur Gelenkdestruktion bei.<sup>6,17,35</sup> Diese Wirkung wird durch Stimulation der Osteoklastogenese über RANKL vermittelt<sup>7,15,18</sup> und durch Zigarettenrauchen verstärkt.<sup>15</sup>

### (g) Weitere Th-Subtypen in der RA

Neben Th1- und Th17-Zellen als Hauptakteure in der Pathogenese der RA konnten in den letzten Jahren weitere Subtypen von CD4+ T-Zellen identifiziert werden, die möglicherweise eine Rolle in der Krankheitsentstehung der RA spielen könnten. Die genauen Mechanismen sind bisher jedoch nicht abschließend geklärt. Eine Aufstellung der relevanten CD4+ Subtypen findet sich in Tabelle 2.

Beispielsweise konnten IL-13, IL-22 und TNF- $\alpha$  produzierende Th22-Zellen in RA-Patienten nachgewiesen werden. Dieser Subtyp hat in anderen entzündlichen Erkrankungen wie Asthma bronchiale, Psoriasis Arthritis oder CED eine proinflammatorische Wirkung, die zur Beförderung der jeweiligen Erkrankung beiträgt.<sup>48</sup>

Als weiterer Subtyp konnten Tfh-Zellen in den Gelenken von RA-Patienten nachgewiesen werden sowie zum Teil auch in den von B-Zellen gebildeten Lymphfollikeln oder Keimzentren.<sup>17</sup> Tfh-Leukozyten sind gekennzeichnet durch ihren Transkriptionsfaktor Bcl-6, ihre Oberflächenmarker PD-1, ICOS und CXCR5 und die Produktion von IL-21<sup>17</sup> und zum Teil IL-17.<sup>15</sup> Die Differenzierung aus naiven T-Zellen zu diesem Subtyp erfolgt angeregt durch IL-6 und ICOS.<sup>17</sup> Von einer Untergruppe von Tfh-Zellen, die kein Bcl-6 exprimieren, wird angenommen, dass sie PD-1/PD-L1 vermittelt B-Zellen in ihrem Reifungsprozess unterstützen.<sup>17</sup>

*Tabelle 2: Übersicht über die an der Pathogenese von RA beteiligten Subtypen von CD4+ T Zellen und ihre Zytokinprofile modifiziert nach Luo et al.<sup>35</sup>*

<b>Stimulierend wirkende Zytokine</b>	<b>→ Th Subtyp →</b>	<b>Produzierte Zytokine</b>
IFN- $\gamma$ , IL-12	Th1	IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2
IL-2, IL-4	Th2	IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-25
IL-2, TGF- $\beta$	T <sub>reg</sub>	<i>CTLA-4, GITR (Oberflächenmarker)</i>
IL-1, IL-6, IL-21, IL-23, TGF- $\beta$	Th17	IL-17A, IL-17F, IL-10 (IL-22)
IL-6, IL-21	Tfh	IL-4, IL-21
IL-4, TGF- $\beta$	Th9	IL-9, IL-10, IL-17, IL-21
IL-6, TNF $\alpha$ , IL-23, IL-1	Th22	IL-22, IL-26, IL-13, TNF $\alpha$

### **(3) Umweltbedingte (beeinflussbare) Risikofaktoren**

Neben den genetischen Risikofaktoren und deren Beförderung durch bestimmte epigenetische Alterationen spielen exogene Faktoren eine wichtige Rolle für das Erkrankungsrisiko, den Krankheitsverlauf und die Krankheitsschwere der RA.<sup>14</sup> Im Gegensatz zu genetischen Prädispositionen sind diese umweltbedingten Risikofaktoren potenziell durch den Patienten beeinflussbar und können somit aktiv den Krankheitsbeginn als auch -progress und die Symptomschwere verbessern bzw. verschlechtern.

Sowohl in Zwillingsstudien als auch in Fall-Kontroll- und Kohortenstudien wie der Nurses' Health Study und der Iowa Women's Health Study konnte Zigarettenrauch als dosisabhängiger, umweltbedingter primärer Risikofaktor für die Entwicklung von einer RA und eine Korrelation zu einer schwereren Symptomlast nachgewiesen werden.<sup>9,10,12,14,64-66</sup> In seropositiven Patienten war diese Korrelation noch ausgeprägter.<sup>66,67</sup>

Als weiterer modifizierbarer Risikofaktor wurde Übergewicht<sup>67-69</sup> in einigen Studien beschrieben. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die vermehrte Leptin-Produktion aus Adipozyten sein, der ein Shift der Th-Zell Subtypen in Richtung des Th1-Phänotyps folgt. Dieser Subtyp von Th-Zellen kann durch Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IL-1 ein Initiator der Pathogenese von rheumatischen Erkrankungen sein.<sup>66</sup>

Ein weiterer wichtiger Bereich, der den Krankheitsverlauf und -progress beeinflussen kann, stellen Ernährungsgewohnheiten dar. Generell scheint eine Ernährungsweise basierend auf der mediterranen Diät für RA-Patienten empfehlenswert zu sein, da sie mit milderen Verläufen und niedrigeren DAS28-Werten assoziiert zu sein scheint.<sup>70</sup> Gerade in mediterranen Ländern wie Italien und Griechenland wurden mildere RA-Verläufe dokumentiert.<sup>11</sup> Die mediterrane Diät zeichnet sich durch einen hohen Gehalt an Früchten und Gemüse, Meeresfrüchten, Nüssen und Hülsenfrüchten und Olivenöl aus. Im Gegensatz dazu tragen rotes Fleisch und gesättigte Fettsäuren nur zu einem geringen Anteil zur Zusammensetzung der Diät bei.<sup>71</sup>

Weiterhin konnte für einige Gewürze, darunter Knoblauch, Ingwer und Zimt, eine symptomverbessernde Wirkung bei RA-Patienten nachgewiesen werden.<sup>70,72</sup> Eine inverse Korrelation ergab sich ebenso jeweils zwischen der Auftretenswahrscheinlichkeit der RA und dem moderaten Konsum von Alkohol<sup>67,68,70</sup> (besonders Rotwein) und dem Bildungsgrad bzw. dem sozialen Status. Auch eine Diät reich an Omega-3 Fettsäuren<sup>70</sup> und Antioxidantien (v.a. Vitamin C und  $\beta$ -Cryptoxanthin) scheint einen protektiven Effekt auf den Verlauf der RA zu haben.<sup>66</sup>

Im Gegensatz dazu liefert der Einfluss von Kaffee- bzw. Koffeinkonsum auf den Krankheitsbeginn und -verlauf bei RA-Patienten bisher uneindeutige, sich teils widersprechende Ergebnisse.<sup>11,14</sup>

## 2.2. Kaffee

Kaffee zählt zu den weltweit täglich am häufigsten konsumierten Getränken<sup>13,14,73,74</sup> mit einer steigenden Tendenz in den letzten Jahrzehnten.<sup>73,74</sup> Kaffee enthält eine Vielzahl von Substanzen.<sup>13,73</sup> Die physiologische Wirkung wird jedoch hauptsächlich den Wirkstoffen Koffein und den Polyphenolen zugeschrieben.<sup>73</sup>

Polyphenole sind Phytochemikalien, die von Pflanzen sekundär zum Schutz gegen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) produziert werden. *In vitro* konnte ihr hohes antioxidatives Potential nachgewiesen werden, jedoch belaufen sich physiologische Plasmakonzentrationen auf maximal 1µmol/L, weshalb die antioxidative Wirkung *in vivo* bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte.<sup>73,75</sup>

Koffein gehört der Familie der Methylxanthine an,<sup>73,76</sup> die klinisch aufgrund ihrer bronchodilatativen Wirkung beispielsweise Anwendung in der Therapie von Asthma bronchiale<sup>76,80</sup> finden (vor allem der Koffeinmetabolit Theophyllin).<sup>76</sup>

Koffein ist neben Kaffee auch in Tee und koffeinhaltigen Getränken wie Energydrinks enthalten.<sup>77</sup> In vielen Ländern wird aufgrund von kulturellen Bräuchen vor allem Tee anstelle von Kaffee konsumiert, was einem Koffeingehalt von ca. 6-22 mg/100ml oder 15-55mg/Tasse<sup>73</sup> entspricht, und gerade in der jüngeren Generation machen Energydrinks einen größeren Anteil der Koffeinquelle aus (34 mg/100ml oder beispielsweise 85mg/Tasse für Red Bull).<sup>73</sup>

Weiterhin ist Koffein Bestandteil von dunkler Schokolade<sup>74</sup> und einiger Schmerzmedikamente.<sup>78</sup> Eine weltweit allgemein gültige Angabe für die pro Tag pro Kopf konsumierte Menge an Koffein zu machen, gestaltet sich aufgrund von unterschiedlichem Konsumverhalten an verschiedenen Orten der Welt und in unterschiedlichen Kulturen demnach als schwierig. *Horrigan et al.* geben für den Kaffeekonsum in ihrer Arbeit ein bis zwei Tassen pro Tag als Durchschnittswert an. Dabei entspricht eine Tasse Kaffee 250ml mit einem Koffeingehalt von 75-100 mg, was einer durchschnittlichen Koffein-Plasmakonzentrationen von ca. 13µM entspricht.<sup>76</sup> Zusätzlich ist für den Kaffeekonsum pro Kopf ein Nord-Süd-Gefälle zu vermerken mit erhöhter Aufnahme in den nördlicheren Regionen. So werden beispielsweise in Großbritannien, Schweden oder Finnland ca. fünf Tassen Kaffee pro Tag getrunken, was einer Koffeinmenge von ca. 100-400 mg pro Tag entspricht.<sup>74</sup> 2015 wurde ein Kaffeekonsum von bis zu 400 mg pro Tag von der European Food Safety Agency (EFSA) als unbedenklich eingestuft.<sup>79</sup>

### 2.2.1. Pharmakologische Aspekte von Koffein

Die Absorption von Koffein erfolgt vollständig innerhalb von 45 Minuten nach Ingestion.<sup>73,77</sup> Dies geschieht unabhängig von Alter, Geschlecht, Genetik und anderen konsumierten Substanzen wie Alkohol oder Medikamenten. Ca. 20% werden bereits im Magen absorbiert, die übrigen 80% im Dünndarm.<sup>77</sup>

Die Spitzenplasmakonzentration von Koffein wird circa 30 Minuten nach oraler Aufnahme erreicht<sup>73</sup> mit durchschnittlichen Werten von 1-10 µM pro Kaffeetasse.<sup>76</sup> Diese Werte können jedoch auch höher ausfallen in Personen, die höhere Koffeinemengen konsumieren oder bei gleichzeitiger Aufnahme von Substanzen, die über CYP1A2 verstoffwechselt werden.<sup>76</sup>

Nach Ingestion und Absorption verteilt sich Koffein gleichmäßig auf alle Körperflüssigkeiten.<sup>80</sup> Koffein ist lipophil genug, um Zellmembranen ohne aktiven Transporter zu überwinden und kann somit die Blut-Hirn-Schranke passieren.<sup>73,77</sup> Aufgrund von einer geringen Plasmaproteinbindung ergibt sich eine Blut-Plasma-Ratio von ungefähr 1.<sup>77</sup>

Die Exkretion von Koffein erfolgt zu 70% renal in Form von Metaboliten.<sup>76</sup> Davon wird nur ein Bruchteil (ca. 2%) unmetabolisiert ausgeschieden, da im Tubulussystem eine fast vollständige Rückresorption von Koffein erfolgt. Über die Faeces werden ca. 2-7% des aufgenommenen Koffeins innerhalb von 48 Stunden eliminiert.<sup>77</sup>

Die Metabolisierung von Koffein erfolgt hauptsächlich hepatisch durch CYP1A2 des Cytochrom P450-System zu Paraxanthin (84%). Weitere biologisch aktive Metabolite stellen Theobromin (12%) und Theophyllin (4%) dar (vgl. Abbildung 1).<sup>76,77</sup> Diese Prozesse folgen einer Kinetik erster Ordnung. Die Metabolisierungsgeschwindigkeit ist zwischen 70-300mg aufgenommenem Koffein gesättigt, abhängig von genetischen Polymorphismen der CYP-Isoformen. Neben genetisch-bedingten interindividuellen Unterschieden beeinflusst weiterhin die generelle Leberfunktion bzw. Lebererkrankungen wie u.a. Leberfibrose und -zirrhose die Metabolisierung.<sup>77</sup>

Während Ernährungsgewohnheiten keinen Einfluss auf die Absorption haben, können sie die Metabolisierung durchaus beeinflussen. So wird die Verstoffwechslung von Koffein durch Grapefruitsaft, Kurkuma, Muskat oder Alkohol verlangsamt.<sup>77</sup> Weiterhin haben viele Medikamente (beispielsweise Antiarrhythmika wie Propranolol oder Verapamil, Antikoagulantien wie Warfarin oder Chinolone wie Ciprofloxacin) und Genussmittel einen verlängernden Einfluss auf die Halbwertszeit (HWZ) von Koffein. Auch orale Kontrazeptiva verringern die Metabolisierungsgeschwindigkeit.<sup>77</sup>

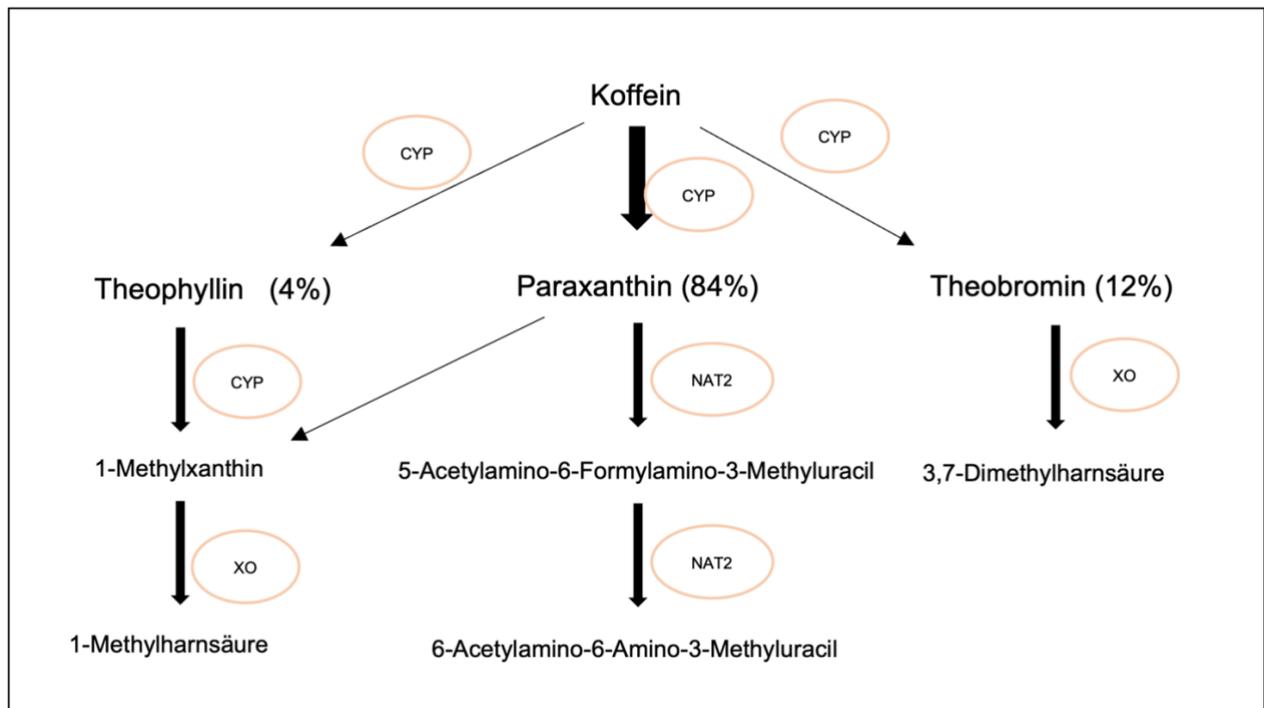
Im Gegensatz dazu bewirkt Zigarettenrauchen, was mit dem gleichzeitigen Konsum von Kaffee assoziiert ist,<sup>66</sup> teilweise fast eine Verdopplung der Metabolisierungsrate durch Enzyminduktion, wodurch die HWZ von Koffein verkürzt wird. Für diese finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben von 2,5 bis 3,5 Stunden bis zu 9,9 Stunden bei Erwachsenen.<sup>76,77,81</sup>

### **2.2.2. Molekulare Ansatzpunkte von Koffein**

Es wird davon ausgegangen, dass Koffein physiologisch seine Wirkung hauptsächlich als Adenosin-Antagonist über die AR A1-A3 entfaltet.<sup>80</sup> Ein weiterer möglicher Ansatzpunkt für

Koffein könnte die Wirkung als Hemmer der zyklischen AMP (cAMP)-Phosphodiesterase (PDE) sein.<sup>76</sup>

Abbildung 2: Schema über Hauptmetaboliten des Koffeinstoffwechsels im Menschen modifiziert nach Nehlig et al. Abk. NAT2, N-Acetyltransferase-2; XO, Xanthinoxidase



### (1) Adenosin und Adenosinrezeptoren (AR)

Adenosin ist eine körpereigene, ubiquitär<sup>82</sup> vorkommende Substanz, die durch ATP-verbrauchende Stoffwechselprodukte entsteht.<sup>83</sup> Adenosin erfüllt im Körper verschiedene Funktionen. Dazu gehören unter anderem die Regulation der Freisetzung von Neurotransmittern, die synaptische Plastizität im ZNS, Vasokonstriktion und -dilatation peripher, Bronchokonstriktion<sup>83</sup> und die Immunregulation<sup>84</sup> unter anderem durch in Kontrollierung von Entzündungsvorgängen und der Heilung von Gewebeschäden.<sup>85</sup> Weiterhin hemmt Adenosin die Lipolyse<sup>83</sup> und spielt eine entscheidende Rolle für die Schlafinduktion.<sup>78</sup>

Adenosin entsteht zum einen extrazellulär aus dem Abbau von Adenin-Nukleotiden und zum anderen intrazellulär bei der Dephosphorylierung von ATP.<sup>76,83</sup> Metabolisiert wird Adenosin über eine Desaminierung zu Inosin und weiter bis zu seinem Endprodukt Harnsäure. Außerdem ist eine Wiederaufnahme in die Zelle und eine Re-Phosphorylierung zu ATP möglich.<sup>86</sup>

Akute inflammatorische Vorgänge und Verletzungen gehen mit einer Erhöhung der extrazellulären Adenosin-Konzentration einher. Im Gegensatz dazu kommt es bei chronisch-entzündlichen Zuständen, wie sie auch bei der RA vorliegen, zu einer Depletion von ATP und somit zu einer Abnahme der Adenosinkonzentration trotz vorherrschender hypoxischer

Bedingungen. Die Expression von AR auf der Zelloberfläche wiederum wird durch das Minderangebot reaktiv hochreguliert.<sup>86</sup>

Adenosin vermittelt seine immunsuppressiven Effekte hauptsächlich über AR. Dies sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR)<sup>82,83</sup> mit sieben Transmembran- $\alpha$ -Helices mit einem extrazellulären Amino-Terminus und einem intrazellulären Carboxy-Terminus.<sup>83</sup> Aktuell sind vier Subtypen (A1-AR - A3-AR)<sup>82</sup> von ARs bekannt, die zum Teil gegensätzliche Funktionen erfüllen. So zählen der A1-AR und der A3-AR zu den inhibitorischen GPCR.<sup>86</sup> Durch sie wird die cAMP-Konzentration intrazellulär gesenkt, wodurch die Aktivität der Proteinkinase A (PKA) und CREB-Phosphorylierung herabgesetzt wird.<sup>83</sup>

Die zwei anderen Subtypen, A2A-AR und A2B-AR, gehören den stimulierenden GPCR an und erhöhen folglich die intrazelluläre cAMP-Konzentration.<sup>83,86</sup> Als wichtiger Vertreter auf Zellen des Immunsystems ist der A2A-AR entscheidend an der Immunhomöostase beteiligt.<sup>87,88</sup> Durch proinflammatorische Mediatoren wie TNF oder IL-1 als wichtige Treiber in der Pathogenese der RA wird die Expression von A2A-AR erhöht.<sup>86</sup> IFN- $\gamma$  wiederum vermindert sowohl Expression als auch Funktion.<sup>86</sup>

In A2A-AR knockout Mäusen wurden eine deutlich erhöhte proinflammatorische Zytokinproduktion (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ ) in mononukleären Zellen und schwerere Erkrankungsverläufe beobachtet<sup>76,84,85</sup> und die Wirkung von MTX scheint zumindest zum Teil durch Akkumulation von Adenosin und seine Wirkung am A2A-AR vermittelt zu werden.<sup>87</sup> A2A-AR-vermittelt verhindert Adenosin die Rekrutierung von Neutrophilen, die klassische Aktivierung von und die Zytokinproduktion durch Makrophagen, die Osteoklastendifferenzierung, die TCR-vermittelte T-Zellaktivierung und deren proinflammatorische Effekte.<sup>86,88</sup> *In vitro* konnte eine dosisabhängige Inhibition der TNF $\alpha$ -,<sup>89,90</sup> IL-12<sup>91,92</sup> und IFN- $\gamma$ <sup>91</sup> Produktion durch Adenosin in menschlichen PBMCs und Makrophagen nachgewiesen werden. Dieser Effekt war in den Studien von *Eigler et al.* und *Link et al.* jeweils durch den Adenosin-Antagonist 8-(3-Chlorostyryl)-Koffein reversibel,<sup>89,92</sup> wodurch sich proinflammatorische Eigenschaften für Koffein annehmen lassen. Koffein in physiologischen Dosen von circa 300 mg, dies entspricht in etwa zwei bis drei Kaffeetassen, weist eine höhere Affinität für die Subtypen A1-AR und A2A-AR auf.<sup>76</sup>

## **(2) Koffein als Phosphodiesterase (PDE-) Hemmer**

Ein weiterer möglicher Ansatzpunkt für Koffein ist die Hemmung des Enzyms cAMP-PDE und darüber die Vermittlung von antiinflammatorischen Effekten.<sup>76</sup> Die PDE ist ein intrazelluläres Enzym, das unter anderem in Makrophagen, T- und B-Zellen und Neutrophilen Granulozyten vorhanden ist.<sup>93</sup> Durch Inhibition der cAMP-PDE steigt die intrazelluläre cAMP-Konzentration an und die PKA wird aktiviert.<sup>76</sup> Es konnte nachgewiesen werden, dass PDE-Hemmer einerseits die Produktion von TNF $\alpha$  in Makrophagen und IFN- $\gamma$  in Th1-Zellen unterdrücken und andererseits die Proliferation von CD4+ Zellen inkomplett hemmen.<sup>93</sup> Die

Produktion ebendieser Zytokine konnte durch Koffein unterdrückt werden,<sup>50,94</sup> sodass die Beteiligung der PDE-Hemmung eine Rolle in der Wirkungsvermittlung von Koffein spielen könnte.

### **2.2.3. Physiologische Wirkung von Koffein**

Koffein ist das weltweit am häufigsten konsumierte legale Psychostimulanz.<sup>71,73,74,77,95</sup> Im zentralen Nervensystem erhöht Koffein die allgemeine Wachheit und Konzentrationsfähigkeit.<sup>73,81</sup> Zusätzlich wirkt es antidepressiv,<sup>74</sup> steigert die Kinetik im Gastrointestinal (GI) -Trakt und renal die Diurese, hat positiv inotrope Eigenschaften kardial und sorgt peripher für Vasodilatation.<sup>73,80</sup>

Während der Konsum von geringeren Dosen eher die zuvor erwähnten, positiven Effekte zu haben scheint, können höhere Koffeindosen unerwünschte Nebenwirkungen wie Angst, Unruhezuständen und Nausea auslösen.<sup>74</sup> Diese Effekte scheinen jedoch einen gewissen Gewöhnungseffekt aufzuweisen und abhängig von der Regelmäßigkeit des Konsums zu sein.<sup>81</sup> Als weitere unerwünschte Nebenwirkungen von Koffein wurden Insomnie,<sup>74</sup> Delir und Psychosen beschrieben vor allem in Individuen mit erhöhter Suszeptibilität für Koffein. Weiterhin wurde von Entzugssymptomen berichtet, die ca. 12-24 Stunden nach dem Absetzen auftreten und bis zu neun Tage andauern können.

Unterschieden werden sollte zusätzlich zwischen der akuten und der chronischen Koffein-Applikation. So wurde beispielsweise von *Johansson et al.* beobachtet, dass eine akute Applikation von Koffein Krampfanfälle auslösen kann,<sup>76</sup> während eine Langzeitbehandlung über 14 Tage die Krampfschwelle bei Mäusen erhöht.<sup>82</sup> Bei einer oralen oder intravenösen Applikation von 5-10g ist Koffein durch Entwicklung eines Lungenödems und folgendem Herzkreislaufstillstand letal.<sup>74</sup>

#### **(1) Wirkung von Koffein auf die Zellen des Immunsystems**

In der Vergangenheit konnte in verschiedenen Studien eine immunmodulatorische Wirkung von Koffein nachgewiesen werden. Dabei gilt Koffein als eine anti-inflammatorisch wirkende Substanz.<sup>13,76</sup> Bereits 1992 wurde in der Arbeitsgruppe von *Rosenthal et al.* beobachtet, dass Koffein die proinflammatorische Zytokinproduktion und Proliferation unter anderem von Th1-Zellen unterdrückt.<sup>76,91</sup> Dies konnte auch von *Ritter et al.* für die Produktion von TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-2 nachgewiesen werden.<sup>96</sup> Gleichzeitig wird die IL-10 Produktion in PBMCs durch Koffein in Kombination mit physischer Aktivität stimuliert<sup>97</sup> und die Zytotoxizität von Lymphozyten<sup>96</sup> gesenkt.

Im Gegensatz dazu scheint Koffein im Mausmodell in niedrigen Dosen einen stimulierenden Effekt auf die B-Zell-Funktion und die Antikörperproduktion auszuüben. Interessanterweise kehrt sich dieser Effekt jedoch bei höheren Dosen um.<sup>76</sup>

Auch Zellen des angeborenen Immunsystems werden durch Koffeineinfluss beeinflusst. So konnte *in vitro* eine verminderte Chemotaxis von NK und Monozyten beobachtet werden.<sup>13</sup>

Jedoch ist bei der Auswertung der Studienergebnisse immer zu beachten, dass in vielen Fällen unphysiologisch hohe Koffeinkonzentrationen verwendet wurden und somit eine Aussagekraft über die Wirkung *in vivo* eingeschränkt wird.<sup>13</sup>

#### **2.2.4. Wirkung von Koffein bei Erkrankungen**

Bezüglich der Wirkung von Koffein auf bestimmte Erkrankungen ist zunächst festzuhalten, dass scheinbar ein krankheitsspezifischer Effekt vorliegt und keine allgemeingültigen Empfehlungen auszusprechen sind.<sup>13</sup>

Es konnten sowohl kardio- als auch neuroprotektive Wirkungen nachgewiesen werden. Ebenso scheint Koffein in niedrigen Dosierungen antidepressiv bzw. stimmungsaufhellend<sup>74</sup> zu wirken und positive Effekte bei Lebererkrankungen wie Leberzirrhose und hepatozellulärem Karzinom (HCC)<sup>98</sup> und Krebserkrankungen wie beim Kolorektalen Karzinom<sup>99</sup> zu haben.

Für neurodegenerativen Erkrankungen (NDE) wie Morbus Parkinson (MP)<sup>73,74,76</sup> und Alzheimer-Demenz konnte eine inverse Korrelation mit Kaffeekonsum beobachtet werden.<sup>74</sup> Bei Alzheimer-Patienten wird eine verbesserte Gedächtnisleistung und sogar eine Gedächtniswiederherstellung bei Individuen mit bereits eingeschränkter Gedächtnisfunktion beschrieben.<sup>73,74</sup> Auch für MS konnte in einigen Fall-Kontroll-Studien und in Mausmodellen ein positiver Effekt auf den Krankheitsverlauf und -progress nachgewiesen werden.<sup>13,76</sup> MS ist ebenso wie die RA eine T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung, die mit Entzündungsherden und progredienten Demyelinisierungen zentral einhergeht.<sup>73</sup> Auch für CED konnte eine inverse Assoziation zwischen Krankheitsaktivität und Kaffeekonsum nachgewiesen werden.<sup>13</sup>

Im Gegensatz dazu scheint das Erkrankungsrisiko von T1DM durch Kaffeekonsum erhöht zu sein.<sup>13</sup>

Für Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis wie Psoriasis-Arthritis (PSA)<sup>103</sup> oder den SLE<sup>100</sup> ist die Studienlage bisher bezüglich des Einflusses von Kaffee und Koffein auf die jeweiligen Erkrankungen begrenzt. Für SLE konnten *Kiyohara et al.* in ihrer randomisiert-kontrollierten Studie ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für SLE unter Kaffeekonsum beschreiben.<sup>104</sup> Im Gegensatz dazu wurden in der Studie von *Iriventi et al.* anti-psoriatische Effekte unter Koffeineinfluss in Kombination mit Kurkuma beobachtet.<sup>101</sup>

#### **2.2.5. Kaffeekonsum und RA**

Die Studienlage für den Einfluss von Kaffeekonsum und die Wirkung von Koffein bei RA-Patienten ist ebenfalls limitiert mit bisher uneindeutigen Ergebnissen.

In ihrer Studie aus dem Jahre 2000 konnten *Heliövaara et al.* eine positive Assoziation zwischen einem Kaffeekonsum von mehr als vier Tassen pro Tag und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von RA nachweisen.<sup>65</sup> Ähnliche Ergebnisse erzielten *Pedersen et al.* in

ihre Fall-Kontroll-Studie in der dänischen Population im Jahre 2006. Sie konnten ebenfalls eine Assoziation zwischen dem Erkrankungsrisiko an der RA und erhöhtem Kaffeekonsum gemessen in Tassen pro Tag feststellen, vor allem bei ACPA+ RA-Patienten.<sup>67</sup> Einschränkend muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass in beiden Studien jedoch keine explizite Unterscheidung bezüglich koffeinhaltigem und entkoffeiniertem Kaffee gemacht wurde.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte in anderen Studien keine Korrelation<sup>64,102</sup> für Kaffeekonsum und das Erkrankungsrisiko an der RA beobachtet werden. In der Iowa Women's Health Study von *Mikul's et al.* wird interessanterweise für einen Konsum von mehr als vier Tassen entkoffeinierten Kaffees ein erhöhtes Risiko für eine RA beschrieben, während keine Assoziation zwischen koffeinhaltigem Kaffee und der RA und eine inverse Korrelation zwischen Teekonsum und der RA vorliegt.<sup>64</sup> Auch in Studien aus der jüngeren Vergangenheit<sup>103-106</sup> konnte keine Assoziation zwischen Kaffee- bzw. Kaffeekonsum und dem Erkrankungsrisiko der RA festgestellt werden. *Mazzucca et al.* beschreiben sogar eine inverse Korrelation zwischen Kaffeekonsum und RA-Risiko.<sup>68</sup> Allerdings wurde nur durch *Westerlind et al.* explizit die Korrelation zwischen Kaffeekonsum und seropositiver RA untersucht.<sup>106</sup>

In allen bisher durchgeführten Studien wurde der Kaffee-, Koffein- und Teekonsum anhand von Fragebögen oder per Interview durch Selbsteinschätzung der Patienten erhoben. Eine Übersicht der Studien findet sich in Tabelle 3. Zu beachten sind die sich unterscheidenden Einschlusskriterien für die Diagnose RA. Während in Studien bis 2010<sup>64,67,102</sup> noch die ACR Klassifikationskriterien 1978 Anwendung fanden, wurden in den kürzlich erschienen Studien zum Teil die neuen ACR/EULAR Kriterien 2010<sup>106</sup> als Grundlage verwendet, RA anhand der ICD-10 Klassifikation<sup>68</sup> festgestellt oder sich auf klinische Angaben<sup>103-105</sup> berufen, was die Vergleichbarkeit der Studien erschwert.

In ihrem systematischen Review aus dem Jahr 2022 ziehen *Asoudeh et al.* ein Fazit aus den bis dahin erschienen Ergebnissen.<sup>64,65,67,102,104</sup> Darin beschreiben sie eine Assoziation zwischen einem erhöhten Erkrankungsrisiko für die RA und dem Konsum von Kaffee und entkoffeiniertem Kaffee. Jedoch konnten sie keine signifikante Assoziation zwischen Kaffeekonsum und dem RA-Erkrankungsrisiko festhalten.<sup>107</sup>

Dieses Fazit wird untermauert und ergänzt durch die Ergebnisse der 2023 publizierten prospektiven Kohortenstudie von *Ascione et al.* Darin konnte auch nach Elimination von möglichen Confoundern wie dem Raucherstatus eine positive Assoziation zwischen dem Konsum von vier oder mehr Tassen Kaffee (expliziert von koffeinhaltigem Kaffee) und einem erhöhten Erkrankungsrisiko an der RA beobachtet werden. Durch den Ausschluss von verschiedenen Störvariablen schlussfolgern die Autoren, dass Koffein somit einen eigenständigen Einfluss auf die Pathogenese der RA hat und nicht ausschließlich synergistisch mit anderen Variablen fungiert.

*Tabelle 3: Übersicht von Studiendesigns über die Korrelation von RA-Erkrankungsrisiko und Kaffee-, Koffein- und Teekonsum. Konsum jeweils erhoben in Tassen pro Tag. Abkürzungen: MCHES (Mobile Clinic Health Examination Survey Study), IWHS (Iowa Women's Health Study), NHS (Nurses Health Study), DNPR (Danish National Patient Registry), WHI-OS (Women's Health Initiative Observational Study), KNHANES (Korea National Health and Nutrition Examination Survey), EIRA (Epidemiological Investigation of RA), NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey), E3N (Étude Épidémiologique auprès des femmes de la Mutuelle Générale de l'Éducation Nationale)*

<b>Studie/Studiename</b>	<b>Studiendesign und Fallzahlen/Kohortengröße</b>	<b>RA Diagnostikkriterien</b>	<b>Studienergebnisse bzgl. Kaffee-, Koffein- und Teekonsum und RA-Risiko</b>
Heliövaara et al. (2000) / MCHES	Kohortenstudie aus Finnland 126/18 981	Krankengeschichte	<ul style="list-style-type: none"> <li>positive Assoziation von RA-Risiko und Kaffeeconsum &gt; 4 Tassen/d für RF+ RA</li> <li>keine Assoziation von RA-Risiko und Kaffeeconsum bei RF- RA</li> </ul>
Mikuls et al. (2002) / IWHS	Prospektive Kohortenstudien aus den USA 158/31 336	ACR Kriterien (1978)	<ul style="list-style-type: none"> <li>positive Assoziation von RA-Risiko und Konsum von &gt; 4 Tassen entkoffeiniertem Kaffee/d</li> <li>keine Assoziation von RA-Risiko und Kaffeeconsum, jedoch höherer Kaffeeconsum assoziiert mit RA-Beginn</li> <li>negative Assoziation von RA-Risiko und Teekonsum</li> </ul>
Karlsen et al. (2003) / NHS	Kohortenstudie aus den USA 480/83 124	ACR Kriterien (1978)	<ul style="list-style-type: none"> <li>keine Assoziation von RA-Risiko und Kaffeeconsum, auch nicht von RF+ RA</li> <li>keine Assoziation von RA-Risiko und Konsum von entkoffeiniertem Kaffee</li> <li>kein protektiver Effekt von Tee auf RA</li> </ul>
Pedersen et al. (2006) / DNPR	Case-Control-Studie aus Dänemark 69/56 691	ACR Kriterien (1978)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Positive Assoziation von RA-Risiko und Kaffeeconsum, v.a. ACPA+ RA</li> </ul>
Lamichhane et al. (2019) / WHI-OS	Kohortenstudie aus den USA 185/76 853	Eigenangabe von RA und Therapie mit DMARDs	<ul style="list-style-type: none"> <li>keine Assoziation von RA-Risiko und Kaffeeconsum</li> <li>schwache positive Assoziation von koffeinhaltigem Teekonsum und RA-Risiko</li> </ul>
Kim et al. (2021) / KNHANES	Cross-sectional Studie aus Korea 95/12.465	Diagnose durch Rheumatologen Antirheumatische Therapie	<ul style="list-style-type: none"> <li>Keine Assoziation von RA-Risiko und Kaffeeconsum in koreanischer Bevölkerung</li> </ul>
Westerlind et al. (2022) / EIRA	Fall-Kontroll-Studie aus Schweden 2184/6385	EULAR/ACR Klassifikationskriterien 2010	<ul style="list-style-type: none"> <li>keine Assoziation von RA-Risiko und Kaffeeconsum (Relation vorhanden, bevor Rauchen als Confounder ausgeschlossen wurde)</li> <li>keine Assoziation für Anti-CCP+ RA und Kaffeeconsum</li> </ul>
Pu et al. (2022) / NHANES	Crosssectional study 275/4 310	Fragebogen mit Angabe RA als Arthritisform	<ul style="list-style-type: none"> <li>keine Assoziation zw. Kaffeeconsum und RA</li> </ul>
Mazzucca et al. (2022) / UK Biobank	prospektive Kohortenstudien aus UK 2819/479 494	ICD-10 Kode M05 oder M06	<ul style="list-style-type: none"> <li>negative Assoziation von RA-Risiko und Kaffeeconsum von 1-2 Tassen/d</li> <li>positive Assoziation von RA-Risiko und Teekonsum</li> </ul>
Ascione et al. (2023) E3N	Prospektive Kohortenstudie aus Frankreich 481/62 631	Eigenangabe von RA und medizinische Datenbank nach Einverständnis	<ul style="list-style-type: none"> <li>positive Assoziation von RA-Risiko und Kaffeeconsum &gt; 4 Tassen/d (Rauchen, BMI, körperliches</li> </ul>

- keine Assoziation zwischen RA-Risiko und Teekonsum

### 2.3. Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Die aktuelle Studienlage bezüglich des Einflusses von Koffein auf das Erkrankungsrisiko und den Krankheitsverlauf der RA liefert bisher uneindeutige Ergebnisse. Kaffee als eines der weltweit am häufigsten konsumierten Getränke könnte somit einen potenziellen Risikofaktor oder einen positiven Einfluss für RA-Patienten darstellen. Kaffeegenuss ist zum einen bei vielen Patienten ein Bestandteil des alltäglichen Lebens und zum anderen ist er beeinflussbar und somit würde es dem Patienten die Möglichkeit geben, eigenständig Einfluss auf die Erkrankung und den Krankheitsverlauf zu nehmen, sollte ein Zusammenhang zwischen Kaffeekonsum und der RA bestehen.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, den Zusammenhang zwischen Kaffeekonsum und dessen Wirkung auf CD4+ T-Zellen von RA-Patienten näher zu untersuchen, vor allem im Hinblick auf den Einfluss auf pro- und anti-inflammatorische Prozesse. Als wichtige Hauptakteure in der Pathogenese und Aufrechterhaltung der chronischen Inflammation soll vor allem die Rolle der proinflammatorischen Th1- und Th17-Zellen von RA-Patienten beleuchtet und der Einfluss von Koffein auf die Zytokinproduktion und das Überleben dieser Zellen *in vitro* untersucht werden. Zum einen soll dadurch beleuchtet werden, ob Kaffeekonsum einen Einfluss auf die Zytokinproduktion von Th1- und Th17-Zellen hat und zum anderen, ob dieser Einfluss einen pro-inflammatorischen oder anti-inflammatorischen Charakter besitzt. Dadurch soll geklärt werden, ob Koffein ein potenziell beeinflussbarer Risikofaktor für den RA-Erkrankungsverlauf und ggf. auch in der Pathogenese ist oder ob – ganz im Gegenteil – Koffein möglicherweise als anti-inflammatorische Substanz protektiv wirken könnte wie in einigen NDE.

Weiterhin soll untersucht werden, über welchen Mechanismus Koffein seine Wirkung auf CD4+ T-Zellen entfaltet. Als potenter Adenosin antagonist soll daher zum einen untersucht werden, ob die von Koffein vermittelte Wirkung über den A2A-AR vermittelt wird und zum anderen, ob ein Unterschied in der Expression des A2A-AR bei RA-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe vorliegt.

### 3. Publikation

#### 3.1. Accepted Manuscript der Originalpublikation

Die folgenden Seiten enthalten das Accepted Manuscript des folgenden Artikels, das im Rahmen dieser Dissertation entstanden ist.

Originalveröffentlichung: Gloyer, L., Golumba-Nagy, V., Meyer, A., Yan, S., Schiller, J., Breuninger, M., ... Kofler, D. (2022). Adenosine receptor A2a blockade by caffeine increases IFN-gamma production in Th1 cells from patients with rheumatoid arthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 51(4), 279–283. DOI: <https://doi.org/10.1080/03009742.2021.1995956><sup>108</sup>

Dies ist ein Accepted Manuscript eines Artikels, der von der Taylor & Francis Group veröffentlicht wurde. Die finale Version (Version of Record) ist unter obigem Link abrufbar. Eine Veröffentlichung des Accepted Manuscripts im institutionellen Repositorium der Universität zu Köln ist unter Berücksichtigung der Lizenzbedingungen (CC BY-NC-ND 4.0) zulässig. Die Tabellen und Figures der Arbeit sowie das Supplementary Material ist im Anhang unter Punkt 6.3. zu finden.

Article type: Brief report

**Adenosine receptor A2a blockade by caffeine increases IFN-gamma production in Th1 cells from patients with rheumatoid arthritis**

Running head: Caffeine increases IFN $\gamma$  production in RA

Lydia Gloyer<sup>1</sup>, Viktoria Golumba-Nagy<sup>1</sup>, Anja Meyer<sup>1</sup>, Shuaifeng Yan<sup>1</sup>, Joanna Schiller<sup>2</sup>, Marianne Breuninger<sup>2</sup>, Dorothee Jochimsen<sup>2</sup>, and David M. Kofler<sup>1,2#</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Immunology, Department I of Internal Medicine, University of Cologne, Cologne, Germany

<sup>2</sup>Division of Clinical Immunology and Rheumatology, Department I of Internal Medicine, University of Cologne and Center for Integrated Oncology Aachen Bonn Cologne Duesseldorf, Germany

#Corresponding author: David M. Kofler, Department I of Internal Medicine, University of Cologne, Kerpenerstr. 62, 50931 Cologne, Germany. E-mail: david.kofler@uk-koeln.de

**Keywords:** Rheumatoid arthritis, caffeine, IFN- $\gamma$ , CD4<sup>+</sup> T cells, adenosine receptor, Th1 cells

None of the data presented in this manuscript has been published elsewhere or is under consideration for publication in another journal.

Total word count: 1,499

## **Abstract**

**Background:** Coffee is one of the most popular beverages in the world. Recent studies indicate that caffeine uptake may be a possible risk factor for rheumatoid arthritis (RA), but a definitive link between caffeine consumption and RA has not yet been established.

**Methods:** Peripheral blood mononuclear cells were obtained from the peripheral blood of healthy individuals and patients with RA. CD4+ T cells were isolated using MACS technique and cultured in vitro with caffeine or mock control. In addition, adenosine was used as a competitive inhibitor of caffeine. After 48 hours, expression of IFN-gamma and IL-17 was analyzed by flow cytometry. Moreover, ex vivo expression levels of adenosine receptor A2a were assessed.

**Results:** Caffeine promotes IFN-gamma production in Th1 cells in vitro. Remarkably, significantly higher concentrations of caffeine are required to increase IFN-gamma levels in Th1 cells from healthy individuals as compared to Th1 cells from patients with RA. Moreover, ex vivo levels of adenosine receptor A2a expression on CD4+ T cells are significantly higher in RA as compared to healthy individuals. Furthermore, caffeine driven IFN-gamma production is completely reversed by adenosine, a competitive agonist of adenosine receptor A2a. In contrast to IFN-gamma, production of IL-17 is not affected by caffeine.

**Conclusions:** Caffeine promotes IFN-gamma production in Th1 cells from RA patients in vitro by competitive inhibition of the adenosine receptor A2a. Our data suggest that excessive coffee consumption could contribute to T cell activation and inflammation in RA.

## Introduction

In the past two decades, coffee consumption has been discussed as a potential risk factor for rheumatoid arthritis (RA) (1-3). Several studies, including a recent meta-analysis, support the assumption that high coffee intake increases the risk of RA development (1, 4). However, a large prospective study conducted in the U.S. by Karlson *et al.* did not find an association between high coffee intake and RA (3). The inconsistency of the results of different studies could be explained by differences in the age of the study participants (3, 4). Moreover, the concentration of caffeine per cup and the coffee drinking habits vary between countries. The highest coffee consumption per capita is found in Finland and other Nordic countries (5). So far, it remains unclear if caffeine has a negative influence on disease activity in RA.

RA is characterized by reduced frequencies of regulatory T ( $T_{reg}$ ) cells and increased frequencies of Th17 cells in the peripheral blood (6). In addition, Th1 cells are believed to play a crucial role in the pathogenesis of RA (7). The number of Th1 cells is significantly increased in the synovial fluid and synovial tissue of RA patients (7). Recently, it has been reported that caffeine induces Th1 cells in a mouse model of tuberculosis (8). Furthermore, caffeine enhances intra-tumoral IFN- $\gamma$  levels by inhibiting the adenosine receptor A2a pathway in mice with melanoma (9). Moreover, the influence of caffeine on the adenosine receptor pathway and on the efficacy of methotrexate is determined by genetics (10). These observations prompted us to investigate the interplay between caffeine, the adenosine receptor A2a and IFN- $\gamma$  production in CD4<sup>+</sup> T cells from RA patients.

## **Methods**

### **Samples**

Peripheral blood was drawn from RA patients at the University Hospital Cologne after written informed consent was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki. All patients fulfilled the 2010 ACR/EULAR classification criteria. The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital Cologne (no. 13-091).

### **Isolation of primary CD4<sup>+</sup> T-cells**

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density gradient centrifugation (PAN-Biotech, Aidenbach, Germany) and CD4<sup>+</sup> T cells were purified by negative selection using the CD4<sup>+</sup> T cell isolation kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Cell purity was verified by flow cytometry and was at least 96%. Viable cells were counted using the automated cell counter CellCountess (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany).

### ***In vitro* cultivation with caffeine**

CD4<sup>+</sup> T cells were cultured for 48 hours in X-Vivo-Medium with 1% Penicillin-Streptomycin, 1% human serum, anti-CD3 antibodies (5 µg/ml), and anti-CD28 antibodies (1 µg/ml). Caffeine (Sigma Aldrich, Hamburg, Germany) was diluted in sterile distilled H<sub>2</sub>O and filtered through sterile 0.2 µm filters to remove microorganisms. Caffeine was added to cell culture at concentrations of 0.1 mM, 0.2 mM, 0.4 mM or 4.0 mM. Sterile distilled H<sub>2</sub>O was used as mock control. Where indicated, adenosine was added at concentrations of 0.4 mM.

### **Flow cytometry**

CD4<sup>+</sup> T cells were permeabilized using the cytofix-permwash kit (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) and intracellular IFN- $\gamma$  and IL-17 was detected by specific antibodies (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Cell viability was assessed by Life-Dead Staining (ThermoFisher Scientific, Schwerte, Germany). Flow cytometry analysis was performed using the Gallios 10/3 flow cytometer (Beckman Coulter, Krefeld, Germany).

### **Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism. Data were analyzed by non-parametric Mann-Whitney test or Student's t-test. Where indicated, medians with interquartile ranges (IQR) are shown.  $p < 0.05$  was considered as statistically significant.

## Results

CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells were isolated from the peripheral blood of RA patients or healthy individuals using MACS technique. The patients' characteristics are summarized in Supplementary table S1. T cells were cultured *in vitro* in the presence of anti-CD3/CD28 monoclonal antibodies and either caffeine or mock control. The purity of the CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cell preparations and the viability of cells were verified by flow cytometry (Supplementary figure S1A,B). After 48 hours, IFN- $\gamma$  and IL-17 expression was assessed by flow cytometry. A representative example of IFN- $\gamma$  and IL-17 detection by flow cytometry is shown in Supplementary figure S2A.

### Effect of caffeine on IFN- $\gamma$ production *in vitro*

Our analysis shows that addition of caffeine at a concentration of 0.4 mM has no influence on IFN- $\gamma$  expression in Th1 cells from healthy individuals while IFN- $\gamma$  is significantly increased by caffeine at a concentration of 4.0 mM (Figure 1A). Interestingly, a caffeine concentration of 0.4 mM is sufficient to increase IFN- $\gamma$  production in Th1 cells from RA patients (median = 2.52 [IQR: 2.13 - 4.00] compared to 1.58 [IQR: 1.03 - 2.86] in the mock control group) ( $p = 0.035$ ) (Figure 1B, Supplementary figure 2B,C). In contrast to IFN- $\gamma$ , the production of IL-17 is not enhanced by caffeine in CD4<sup>+</sup> T cells from RA patients (Figure 1C, Supplementary figure S2D). Moreover, caffeine has no influence on the frequency of IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Th17.1 cells (Supplementary figure S2E). In our experiments, the frequency of Th17 cells was very low (0.01 - 0.24 %) in healthy controls in the absence of Th17 skewing cytokines and IL-17 production was not increased by caffeine (data not shown as almost no expression of IL-17 was detected with or without caffeine). A bias due to medical treatment resulting in altered cytokine production could be excluded as the treatment of the patients has no influence on caffeine-induced IFN- $\gamma$  production (Supplementary figure S2F). Th1 cells from untreated patients do not respond differently to caffeine than Th1 cells from patients treated with

DMARDs. Moreover, caffeine has no influence on the viability of CD4<sup>+</sup> T cells (Supplementary figure S2G). Lower concentrations of caffeine (0.1 mM or 0.2 mM) are not sufficient to increase IFN- $\gamma$  levels (Supplementary figure S2H). Interestingly, caffeine does not modulate IFN- $\gamma$  production in CD8<sup>+</sup> T cells (Supplementary figure S3A,B).

### **Link between *ex vivo* levels of adenosine receptor A2a expression and sensitivity of Th1 cells to caffeine**

In a next step, we aimed to reveal the mechanistic pathway which is responsible for caffeine-induced IFN- $\gamma$  production. Caffeine binds to the adenosine receptor A2a, thereby preventing adenosine from activating the receptor (11). We therefore analyzed the expression levels of A2a on *ex vivo* CD4<sup>+</sup> T cells from RA patients and healthy controls (Supplementary figure S3C,D). Interestingly, adenosine receptor A2a is significantly higher expressed on CD4<sup>+</sup> T cells from RA patients as compared to healthy controls ( $6.6 \pm 0.5$  vs.  $0.7 \pm 0.2$  %;  $p = 0.0002$ ) (Figure 2A).

To verify if altered A2a expression is responsible for higher sensitivity to caffeine, we incubated CD4<sup>+</sup> T cells from RA patients with adenosine, which is a competitive inhibitor of caffeine. We found that addition of adenosine completely inhibits the effect of caffeine on INF- $\gamma$ , thereby suggesting that binding of caffeine to adenosine receptor A2a is responsible for caffeine-induced INF- $\gamma$  production ( $2.3 \pm 0.3\%$  vs.  $5.0 \pm 0.3$ ;  $p = 0.02$ ) (Figure 2B).

## Discussion

Caffeine is a non-selective antagonists of adenosine receptors A1, A2a, A3, and A2b, with the highest affinity to A2a (11). Most biological effects of caffeine are mediated via blockade of these receptors (11). Moreover, activation of the adenosine receptor A2a by adenosine has been shown to promote cAMP-mediated inhibition of IFN- $\gamma$  transcription in Th1 cells (Figure 3) (12). Here we show that blockade of this negative feed-back loop by caffeine increases IFN- $\gamma$  production in Th1 cells from RA patients. Significantly lower concentrations of caffeine are sufficient to promote IFN- $\gamma$  production in Th1 cells from RA patients as compared to healthy individuals. Our findings are in line with previous studies reporting that inhibition of A2a by caffeine increases IFN- $\gamma$  production in mouse models of tuberculosis and cancer (8, 9). Importantly, caffeine has also been shown to reduce immunosuppressive effects of methotrexate by competing with adenosine (13). Abstinence from caffeine has been suggested as a possible strategy to improve the efficiency of methotrexate treatment in RA (13).

Smoking is an important environmental risk factor for RA development and progression. In our study, information about the smoking status of the patients was not available. The impact of smoking on caffeine-driven IFN- $\gamma$  production remains therefore unknown. Our experiments show that high concentrations of caffeine are required for the induction of IFN- $\gamma$ . Although coffee consumption will not lead to systemic caffeine concentrations of  $\geq 0.4$  mM, a recent report provides evidence that these high concentrations can be reached locally by passive diffusion of caffeine through biological barriers (14). The mucosal tissue of the gut represents an important interface between microbiota and the immune system. The microbiota of RA patients is significantly altered and contains molecular mimicry of human antigens related to RA (15). The mucosal tissue of the gut, along with the mucosal tissue of the lung, is therefore considered to be a possible origin of autoimmune reactive CD4<sup>+</sup> T cells in RA (15). Gut-derived autoimmune T cells can circulate in the body and accumulate in inflamed joints. High caffeine concentrations may therefore facilitate the differentiation of mucosal CD4<sup>+</sup> T cells into

autoimmune Th1 cells and increase IFN- $\gamma$  production, thereby promoting systemic inflammation in RA.

Importantly, the adenosine receptor A2a is upregulated by activation of CD4<sup>+</sup> T cells (16). A higher activation status of autoimmune CD4<sup>+</sup> T cells could be responsible for elevated A2a expression in RA patients. Moreover, it has been shown that TCR-induced IFN- $\gamma$  production can be inhibited by adenosine analogs (16). To the best of our knowledge, this is the first report of caffeine-induced IFN- $\gamma$  production by CD4<sup>+</sup> T cells from patients with rheumatoid arthritis.

## **Conclusion**

Caffeine promotes *in vitro* IFN- $\gamma$  production in Th1 cells from RA patients by inhibiting the adenosine receptor A2a. Moreover, the sensitivity of Th1 cells from RA patients to caffeine is significantly higher as compared to Th1 cells from healthy individuals. Our data support the assumption that excessive caffeine consumption could contribute to T cell activation and inflammation in RA.

## **Acknowledgement**

The authors thank Thom Haak for excellent technical assistance.

## **Funding**

The work was supported by grants from Fritz Thyssen foundation (10.17.2.019MN), Köln Fortune Program of the Faculty of Medicine, University of Cologne (grants 233/2017, 330/2018, 324/2020, 369/2020, 479/2020 and 480/2020) and the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF): Professorinnenprogramm II, Förderung der Regelprofessur im Fach Achäoinformatik – 01FP14039G, Projekt-Nr.: 4600/8116/01.

## **Disclosure statement**

No potential conflict of interest was reported by the authors.

## Figure legends

**Figure 1. Caffeine increase IFN- $\gamma$  production *in vitro*.** (A) Percentage of IFN- $\gamma$  positive cells among CD4<sup>+</sup> T cells from healthy controls cultured with 0.4 mM or 4.0 mM caffeine or mock control (n= 14). (B) Percentage of IFN- $\gamma$  positive cells among CD4<sup>+</sup> T cells from RA patients cultured with 0.4 mM or 4.0 mM caffeine or mock control (n=21). (C) IL-17 expression in CD4<sup>+</sup> T cells from RA patients cultured with 0.4 mM or 4.0 mM caffeine (n=18). IFN- $\gamma$  and IL-17 were detected by flow cytometry. Significance was calculated using non-parametric Mann-Whitney test; \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.001. Additional results obtained from experiments including more patient samples are presented in Supplementary figure S2.

**Figure 2.: *Ex vivo* levels of adenosine receptor A2a.** (A) Percentage of A2a positive cells among CD4<sup>+</sup> T cells from healthy controls (HC) and RA patients (HC: n= 9; RA: n =14). Significance was calculated using students t-test and medians with interquartile ranges are shown. (B) Inhibition of caffeine-induced IFN- $\gamma$  production by adenosine. Significance was calculated by non-parametric Mann-Whitney test; \* $p$ <0.05, \*\*\*\* $p$ <0.0005.

**Figure 3. Schematic view of the link between caffeine, IFN- $\gamma$  and adenosine receptor A2a.** TCR activation promotes IFN- $\gamma$  transcription (labeled in the figure as [1]) and upregulates CD73 [2], thereby increasing adenosine concentration in the supernatant [3] (16). In addition, TCR activation induces A2a expression [4] (16). As a consequence, binding of adenosine to A2a inhibits IFN- $\gamma$  transcription [5] (16). Competitive blocking of A2a by caffeine prevents A2a pathway activation and interrupts the negative feed-back loop [6] (8, 9).

## Supporting information

### Supplementary Table S1: Demographic characteristics.

**Supplementary Figure S1: Purity of cell preparation and viability of cells. (A)** Flow cytometry analysis of cell viability and doublet discrimination. A representative example of CD4<sup>+</sup> T cell analysis after 48 hours of cell culture is shown. **(B)** Purity of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell populations.

**Supplementary Figure S2: Influence of caffeine on IFN- $\gamma$  and IL-17 production in CD4<sup>+</sup> T cells from RA patients. (A)** Representative example of flow cytometry analysis of IFN- $\gamma$  and IL-17 expression in CD4<sup>+</sup> T cells cultured *in vitro* with 0.4 mM caffeine (*w/o*, cell culture without supplements; *H<sub>2</sub>O*, cell culture with H<sub>2</sub>O as a control for caffeine; *caffeine*, cell culture with 0.4 mM caffeine). **(B)** Percentage of IFN- $\gamma$  positive cells among CD4<sup>+</sup> T cells from RA patients cultured with 0.4 mM (n=40) or **(C)** 4.0 mM (n=25) caffeine or with mock control (H<sub>2</sub>O). **(D)** IL-17 expression in CD4<sup>+</sup> T cells from RA patients cultured with 0.4 mM caffeine (n=40). **(E)** Frequency of IFN- $\gamma$  and IL-17 double positive Th17.1 cells. **(F)** Influence of previous treatment on caffeine-induced IFN- $\gamma$  production. The analyzed blood samples were obtained from patients who were untreated or treated with conventional DMARDs, biological DMARDs or targeted synthetic DMARDs. No significant influence of treatment on IFN- $\gamma$  was observed. **(G)** The cell viability is not affected by caffeine. CD4<sup>+</sup> T cells were cultured for 48 hours as described previously in the presence of plate-bound anti-CD3 (5  $\mu$ g/ml) and soluble anti-CD28 (1  $\mu$ g/ml) antibodies. After 48 hours, cell viability was assessed by flow cytometry using Live-Dead staining. Fold change in viability compared to negative control is shown. **(H)** CD4<sup>+</sup> T cells from RA patients were cultured as described above in the presence of different caffeine concentrations. No increase in IFN- $\gamma$  production is observed at concentrations below 0.4 mM.

**Supplementary Figure S3: Caffeine has no influence on IFN- $\gamma$  in CD8<sup>+</sup> T cells.** (A) Representative example showing IFN- $\gamma$  production in CD8<sup>+</sup> T cells from RA patients in the presence of caffeine. (B) Summary of results obtained from experiments with CD8<sup>+</sup> T cells.

**Supplementary Figure S4: A2a expression on CD4<sup>+</sup> T cells.** Representative examples of *ex vivo* flow cytometry analysis of A2a receptor expression are shown. (A) A2a expression on CD4<sup>+</sup> T cells from healthy individuals. (B) A2a expression on CD4<sup>+</sup> T cells from RA patients.

## References

1. Heliövaara M, Aho K, Knekt P, Impivaara O, Reunanen A, Aromaa A. Coffee consumption, rheumatoid factor, and the risk of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2000;59:631-5.
2. Bae SC, Lee YH. Coffee consumption and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: a Mendelian randomization study. *Clin Rheumatol* 2018;37:2875-9.
3. Karlson EW, Mandl LA, Aweh GN, Grodstein F. Coffee consumption and risk of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:3055-60.
4. Lee YH, Bae SC, Song GG. Coffee or tea consumption and the risk of rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Clin Rheumatol* 2014;33:1575-83.
5. Gavriluyk O, Braaten T, Skeie G, Weiderpass E, Dumeaux V, Lund E. High coffee consumption and different brewing methods in relation to postmenopausal endometrial cancer risk in the Norwegian women and cancer study: a population-based prospective study. *BMC Womens Health* 2014;14:48.
6. Meyer A, Wittekind PS, Kotschenreuther K, Schiller J, von Tresckow J, Haak TH, et al. Regulatory T cell frequencies in patients with rheumatoid arthritis are increased by conventional and biological DMARDs but not by JAK inhibitors. *Ann Rheum Dis* 2019; doi: 10.1136/annrheumdis-2019-216576.
7. Chemin K, Gerstner C, Malmström V. Effector Functions of CD4+ T Cells at the Site of Local Autoimmune Inflammation-Lessons From Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol* 2019;10:353.
8. Amaral EP, Machado de Salles É, Barbosa Bomfim CC, Salgado RM, Almeida FM, de Souza PC, et al. Inhibiting Adenosine Receptor Signaling Promotes Accumulation of

- Effector CD4<sup>+</sup> T Cells in the Lung Parenchyma During Severe Tuberculosis. *J Infect Dis* 2019;219:964-74.
9. Tej GNVC, Neogi K, Nayak PK. Caffeine-enhanced anti-tumor activity of anti-PD1 monoclonal antibody. *Int Immunopharmacol* 2019;77:106002.
  10. Soukup T, Hloch K, Dosedel M, Tebbens JD, Nekvindova J, Sembera S, et al. The influence of coffee intake and genetics on adenosine pathway in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics*. 2020;21:735-739.
  11. Cheng RKY, Segala E, Robertson N, Deflorian F, Dore AS, Errey JC, et al. Structures of Human A1 and A2A Adenosine Receptors with Xanthines Reveal Determinants of Selectivity. *Structure*. 2017;25:1275-1285.e1274.
  12. Csóka B, Himer L, Selmeczy Z, Vizi ES, Pacher P, Ledent C, et al. Adenosine A2A receptor activation inhibits T helper 1 and T helper 2 cell development and effector function. *FASEB J* 2008;22:3491-3499.
  13. Montesinos MC, Yap JS, Desai A, Posadas I, McCrary CT, Cronstein BN. Reversal of the antiinflammatory effects of methotrexate by the nonselective adenosine receptor antagonists theophylline and caffeine: evidence that the antiinflammatory effects of methotrexate are mediated via multiple adenosine receptors in rat adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:656-63.
  14. di Cagno MP, Clarelli F, Våbenø J, Lesley C, Rahman SD, Cauzzo J, et al. Experimental Determination of Drug Diffusion Coefficients in Unstirred Aqueous Environments by Temporally Resolved Concentration Measurements. *Mol Pharm* 2018;15:1488-94.
  15. Zhang X, Zhang D, Jia H, Feng Q, Wang D, Liang D, et al. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nat Med* 2015;21:895-905.

16. Lappas CM, Rieger JM, Linden J. A2A adenosine receptor induction inhibits IFN-gamma production in murine CD4+ T cells. *J Immunol* 2005;174:1073-80.

## 4. Diskussion

Die Pathogenese der RA bleibt trotz neuer Forschungsmethoden weiterhin unvollständig verstanden.<sup>9</sup> Vor allem Umwelteinflüsse wie Ernährungsgewohnheiten stehen dabei in Wechselwirkung mit genetischer Prädisposition, sodass ein heterogenes Netz aus sich gegenseitig beeinflussenden Faktoren entsteht.<sup>9</sup> Kaffee stellt eines der weltweit am häufigsten konsumierten Getränken dar mit Koffein als einem Hauptbestandteil.<sup>73</sup>

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Koffein auf CD4+ Th-Zellen von RA-Patienten untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass Koffein die IFN- $\gamma$  Produktion in Th1-Zellen von RA-Patienten erhöht und dies über die Inhibition des A2A-AR bewirkt.

### 4.1. Limitationen und Stärken der Arbeit

Eine der Stärken dieser Arbeit ist, dass sie meines Wissens eine der ersten Studien ist, die die Wirkung von Koffein auf Th1- und Th17-Zellen von RA-Patienten und deren Zytokinproduktion *in vitro* untersucht hat. Durch das Screening der Patienten vor der Blutentnahme konnte außerdem sichergestellt werden, dass nur Patienten in die Studie eingeschlossen wurden, die die diagnostischen Kriterien nach EULAR-Kriterien 2010 erfüllen. Angemerkt sei hier, dass die Ergebnisse möglicherweise dadurch eingeschränkt werden, dass in die gesunde Kontrollgruppe auch Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen eingeschlossen wurden wie z.B. SLE-Patienten. Gleichzeitig lässt sich dadurch sicherstellen, dass die beobachteten Effekte RA-spezifisch sind und nicht generalisiert bei Autoimmunerkrankungen zu werten sein sollten.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass reines Koffein verwendet wurde und somit eine mögliche Beeinflussung durch weitere Inhaltsstoffe ausgeschlossen werden kann, wie es der Fall gewesen wäre, wenn statt Koffein konventionell zubereiteter Kaffee benutzt worden wäre. Gerade im Vergleich zur aktuellen Literatur ist dies ein großer Vorteil, da die bisherigen Studien zumeist den Kaffee- und nicht spezifisch den Koffeinkonsum untersucht haben. Auch wenn explizit auf Koffeinkonsum gefiltert wurde, können Wechselwirkungen mit anderen molekularen Bestandteilen von Kaffee nicht sicher ausgeschlossen werden.

Ein Nachteil ist die Verwendung von teils unphysiologisch hohen Koffeindosen von 400  $\mu$ M und 4000  $\mu$ M. Physiologisch wird eine Plasmakonzentration von Koffein von 1-10  $\mu$ M/Tasse erreicht.<sup>76</sup> Konzentrationen in dieser Höhe könnten jedoch physiologisch im Darmlumen erreicht werden, wenn davon ausgegangen wird, dass eine Tasse Kaffee von 250 ml einer Koffeinkonzentration von 75-100 mg entspricht.<sup>76,109</sup>

Ein weiterer Schwachpunkt ist die Verwendung von H<sub>2</sub>O als Lösungsmittel für Koffein. H<sub>2</sub>O gilt generell als zytotoxisch. Um eine vermehrte Zytotoxizität von den Proben mit Koffein auszuschließen, wurde zum einen die Kontrolle mit H<sub>2</sub>O angesetzt und zum anderen

Überlebensraten mittels Durchflusszytometrie bestimmt, ohne einen signifikanten Unterschied festzustellen.

Fraglich bleibt weiterhin die Übertragbarkeit von einem *in vitro* Experiment in den Menschen. In dieser Studie wurde einzig Koffein untersucht. Somit lässt sich nicht endgültig festhalten, ob Kaffeekonsum an sich einen gesundheitsschädlichen Effekt für RA-Patienten haben könnte, da Kaffee aus einer Vielzahl von sich möglicherweise gegenseitig beeinflussenden Substanzen besteht und diese weiterhin abhängig von der Zubereitungsart sind.<sup>110</sup> Dies könnte jedoch einen Ansatzpunkt für die sich teils widersprechenden Ergebnisse in der Literatur liefern.

## **4.2. Einordnung der Ergebnisse dieser Dissertation in den aktuellen Forschungsstand zum Einfluss von Koffein auf die RA**

Insgesamt ist das aktuelle Wissen bezüglich des Einflusses von Koffein auf die Pathogenese der RA limitiert. Es wurden bisher einige Studien durchgeführt, in denen der Zusammenhang zwischen Kaffeekonsum in Tassen pro Tag und dem Einfluss auf die RA untersucht wurde.<sup>64,65,67,68,102-106,111</sup> Jedoch wurde nicht in allen Studien zwischen koffeinhaltigem und entkoffeiniertem Kaffee unterschieden. Weiterhin unterscheiden sich die Studien durch ihre Einschlusskriterien, insbesondere dadurch, dass ein Teil der Studien vor 2010 erschienen ist und somit bevor die neuen EULAR-Kriterien veröffentlicht wurden.<sup>64,65,67,102</sup> In mehreren Studien konnte eine positive Assoziation zwischen hohen Koffeindosen (> 4 Tassen/d) und der RA beobachtet werden,<sup>65,67,111</sup> während in anderen Studien keine signifikante Korrelation bestand.<sup>68,102-105</sup> Im Review-Artikel von *Asoudeh et al.* werden diese Studien miteinander verglichen und das Fazit gezogen, dass eine Assoziation zwischen Kaffee und RA besteht, jedoch keine Assoziation zwischen Kaffeekonsum und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von RA.<sup>107</sup>

Über die Effekte von Koffein auf zellulärer Ebene und insbesondere auf die Treiber der Pathogenese der RA wie Th1-Zellen ist bisher weiterhin wenig bekannt.

### **4.2.1. Bedeutung für Forschung und klinische Relevanz**

#### **(1) Koffeinwirkung: zu erwartende Effekte**

In anderen chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie CED konnte bereits eine inverse Korrelation zwischen der Krankheitsschwere und Kaffeekonsum beobachtet werden.<sup>13</sup> Koffein gilt insgesamt als anti-inflammatorische Substanz, die die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen von Th1-Zellen unterdrücken kann.<sup>94,96</sup> Diese Effekte könnten auf die Funktion von Koffein als cAMP-PDE-Hemmer zurückgeführt werden. Aktivierung der cAMP-PDE bewirkt physiologisch eine Bahnung von pro-inflammatorisch wirksamen Zytokinen über eine Verminderung der intrazellulären cAMP-Konzentration.<sup>93</sup> Unter anderem konnte eine erhöhte Aktivität der PDE in PBMCs durch IFN- $\gamma$  und Lipopolysaccharide (LPS)

beobachtet werden, während anti-inflammatorische Zytokine wie IL-4 und IL-10 die Enzymaktivität verringern.<sup>93</sup> In Lymphozyten wird die Aktivierung der cAMP-PDE durch TZR-Bindung, Phytohämagglutinin (PHA) und Concanavalin A (Con A) bewirkt.<sup>93</sup> Somit wäre für Koffein als PDE-Inhibitor ein anti-inflammatorischer Effekt zu erwarten.

Eine Hemmung der cAMP-PDE bewirkt über die Inhibition von TNF- $\alpha$ - und IFN- $\gamma$ -Produktion in Makrophagen bzw. Th1-Zellen die Differenzierung und Aktivierung von Th-Zellen in Richtung eines pro-inflammatorischen Phänotyps.<sup>93</sup>

In unserer Studie konnte im Gegensatz dazu jedoch eine erhöhte Produktion des pro-inflammatorischen IFN- $\gamma$  beobachtet werden. Dies widerspricht der allgemeinen Auffassung bezüglich der anti-inflammatorischen Wirkung von Koffein.

Adenosin als ubiquitär im menschlichen Körper vorkommende Substanz gilt jedoch ebenfalls als anti-inflammatorisch.<sup>84,85</sup> Koffein ist ein bekannter Adenosin-Antagonist,<sup>80</sup> wodurch eine mögliche pro-inflammatorische Wirkungskomponente von Koffein in Betracht gezogen werden sollte. Adenosin verhindert unter anderem die Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten sowie die klassische Aktivierung und Zytokinproduktion in Makrophagen und die T-Zellaktivierung.<sup>86,88</sup> So konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass durch Adenosin die Produktion von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  in PBMCs reduziert wird, was eine Differenzierung zu Th1-Zellen eher verhindert. Dieser Effekt ließ sich durch Koffein umkehren.<sup>89,92</sup> Dies ist in Übereinstimmung mit der in dieser Studie beobachteten erhöhten, A2A-AR vermittelten IFN- $\gamma$  Produktion in Th1-Zellen.

Dass der A2A-AR wichtig für die Immunmodulation zu sein scheint, konnte in A2A-AR knockout Mäusen nachgewiesen werden. Hier wurden eine erhöhte pro-inflammatorische Zytokinproduktion (IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$ ) und dementsprechend schwerere Krankheitsverläufe beobachtet.<sup>76,84</sup> Somit könnte durch die vorliegende Studie postuliert werden, dass Koffein als Antagonist an diesem Rezeptor einen ähnlichen Einfluss hat wie ein Mangel des Rezeptors.

Weiterhin wichtig erscheint die Tatsache, dass es bei chronisch-entzündlichen Vorgängen zu einer Depletion von Adenosin und einer reaktiven Hochregulation der A2A-AR Expression kommt. Zum einen fallen dadurch die anti-inflammatorischen Effekte von Adenosin weg, wodurch es zu einem sich selbst verstärkenden Entzündungskreislauf kommen kann.<sup>86</sup> Zum anderen könnte die reaktive Hochregulation des A2A-AR<sup>86</sup> ein möglicher Erklärungsansatz dafür sein, weshalb die IFN- $\gamma$  Produktion in Th1-Zellen in der aktuellen Studie signifikant höher war als in der gesunden Kontrollgruppe. Eine erhöhte Rezeptordichte erleichtert die Bindung von Koffein an die Th1-Zellen und könnte somit das Wirkungsausmaß verstärken.

Hier sei außerdem angemerkt, dass die beobachteten anti-inflammatorischen Effekte von Koffein in Studien beobachtet wurden, bei denen unphysiologisch hohe Dosen von Koffein eingesetzt wurden.<sup>96,97</sup> Es bleibt somit fraglich, ob die beobachteten Effekte sich eins-zu-eins auf die physiologische Wirkung von Koffein übertragen lassen.

## (2) Rolle des Mikrobioms

Ein weiterer möglicher Ansatzpunkt für die Wirkungsvermittlung von Koffein auf Immunzellen könnte der menschliche Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt) und das dort angesiedelte menschliche Mikrobiom spielen. In den letzten Jahren ist die Bewusstheit über die Rolle, die die kommensalen Mikrobiota für die allgemeine Gesundheit spielen, deutlich gewachsen.<sup>112-114</sup>

Das menschliche Mikrobiom ist nach Joshua Lederberg definiert als eine ökologische Gemeinschaft von kommensalen, symbiotischen und pathogenen Mikroorganismen, die sich den Körperraum teilen.<sup>115</sup>

Bei Erwachsenen gehören die Mikrobiota typischerweise der Gattung der Firmicutes und Bacteroidetes<sup>115-117</sup> sowie anteilmässig geringer der Actinobacteria<sup>118</sup>, Fusobacteria und Proteobacteria an.<sup>112,113,115,119,120</sup> Die Zusammensetzung des Mikrobioms bzw. der Mikrobiota wandelt sich während der gesamten Lebensspanne eines Menschen abhängig von Geographie, eingenommenen Medikamenten und Ernährungsgewohnheiten.<sup>114-116,118,121</sup>

Die Funktion der enteralen Mikrobiota ist die Aufrechterhaltung von Gesundheit durch Produktion von anti-inflammatorischen Metaboliten wie beispielsweise Short Chain Fatty Acids (SCFA),<sup>122</sup> die Stabilisation der Barrierefunktion des Darmepithels, die Produktion von essentiellen Vitaminen und Aminosäuren<sup>115,119</sup> und die Entwicklung des Immunsystems.<sup>112,113</sup> Die Bacteroides Spezies (spp.), zugehörig zur Gattung der Bacteroidetes, ist dabei ein wichtiger Spieler mit einer vermehrten Prävalenz in westlichen Ländern.<sup>118</sup> Ihr Vorkommen wird durch eine omnivore ballaststoffreiche und proteinreiche Ernährung gefördert.<sup>118</sup> Die Bacteroides spp. und insbesondere Bacteroides fragilis befördern durch Polyssaccharid A (PSA) -Produktion die CD4+ T-Zelldifferenzierung in Richtung eines anti-inflammatorischen Phänotyps mit IL-10 Produktion.<sup>118,123</sup>

Weitere wichtige Vertreter in der westlichen Welt sind die den Actinobacteria angehörige Bifidobacterium spp.<sup>124</sup> und die den Firmicutes zugehörige Lactobacillus spp., die als probiotisch gelten.<sup>125</sup> Die Firmicutesanzahl scheint durch eine ballaststoffreiche Ernährung gefördert zu werden,<sup>126</sup> wodurch gesundheitsförderliche Wirkungen vermittelt werden.<sup>126,127</sup>

Für eine gute enterale Gesundheit und somit ein gesundes Immunsystem ist die Balance zwischen symbiontischen und pathobiontischen Organismen entscheidend. Gerät diese aus dem Gleichgewicht, spricht man von einer Dysbiose mit veränderter Immunfunktion.<sup>112,116</sup>

Das enterale Mikrobiom kommuniziert und beeinflusst das lymphatische Gewebe in der Darmwand<sup>115,116</sup> unter anderem durch die Produktion von SCFA. Diese können beispielsweise die IL-10 Produktion und Sekretion in DCs steigern, was wiederum eine Differenzierung von Th-Zellen Richtung T<sub>reg</sub>-Zellen und somit anti-inflammatorische Effekte befördert.<sup>112</sup>

Eine westliche Diät und die damit vergesellschaftete Zusammensetzung der Mikrobiota ist im Vergleich zur afrikanischen Population mit einem vermehrtem Auftreten von DM,

kolorektalem Karzinom und Herzerkrankungen assoziiert.<sup>114,128</sup> Durch eine westliche Diät wird die enterale Barrierefunktion gestört,<sup>116</sup> während eine ballaststoffreiche Ernährung insgesamt als gesundheitsförderlich gilt.<sup>128</sup> Weiterhin wurde eine ballaststoffarme Ernährung mit erhöhtem Risiko für Brust- und Prostatakrebs assoziiert. Eine Hypothese für die Verbindung zwischen dem GI-Trakt und diesen entfernten Manifestationsorten ist die Annahme, dass durch ein Fehlen von SCFA entzündliche Prozesse in der Darmmukosa angestoßen werden, was wiederum entweder zu einer Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen im Darm führt oder diese aktivierten pro-inflammatorischen Zellen selbst in die entfernten Organe wandern können.<sup>112</sup>

### (a) Das Mikrobiom und Koffein

Der GI-Trakt stellt die erste Kontaktfläche von Kaffee und Koffein zum Körper dar.<sup>110</sup> Kaffee wird unter anderem durch Kolonmikrobiota verstoffwechselt. Aufgrund der Komplexität der molekularen Bestandteilen von Kaffee wird wenig davon im Dünndarm resorbiert und muss somit im Kolon metabolisiert werden.<sup>119</sup> Die physiologische Wirkung von Kaffee auf den GI-Trakt umfasst unter anderem eine Erhöhung der Speichelproduktion, der Sekretion von Gastrin, Hydrochloresäure und Pancreasenzymen und eine vermehrte Kolonmotilität.<sup>129</sup> Auch konnte ein vermindertes Risiko für das Auftreten von bestimmten Karzinomen beobachtet werden darunter das Colon-,<sup>110,130</sup> Prostata- und Leberkarzinom,<sup>110</sup> während eine verminderte Mikrobiodiversität mit ungünstigeren Verläufen bei Kolonkarzinom und CED assoziiert ist.<sup>130</sup>

Insgesamt ist die Studienlage bezüglich des Zusammenhangs zwischen Koffein und den humanen Mikrobiota begrenzt mit teils widersprüchlichen Ergebnissen.<sup>130</sup>

Im Mausmodell wurde beobachtet, dass eine verminderte Mikrobiomdiversität ausgelöst durch eine High Fat Diät durch Koffein reversibel ist.<sup>131</sup> Dabei verminderte Koffein unter anderem die Anzahl von Bacteroidetes und Lactobacillus und erhöhte die Anzahl an Desulfovibrio, Faecalibaculum und Bifidobacterium.<sup>131</sup> Ein ähnliches Ergebnis erzielte auch die Gruppe um *Zhu et al.*, die in ihrer Arbeit eine erhöhte Firmicutes-Bacteroidetes-Ratio beschreiben.<sup>132</sup> *Dai et al.* konnten eine erhöhte Diversität bei erhöhtem Kaffeekonsum ( $\geq 3$  Tassen Kaffee/d) nachweisen mit vermehrtem Vorkommen von Prevotella und Faecalibacterium.<sup>130</sup>

Ein vermehrtes Vorkommen der Bifidobacterium spp., der Prevotella spp. und der Firmicutes spp. konnte auch in weiteren Studien beobachtet werden.<sup>133</sup> Beispielsweise konnte eine vermehrte Anzahl der Bifidobacterium spp. sowohl im Mausmodell als auch im Menschen nachgewiesen werden.<sup>130,133</sup> Durch regelmässigen Kaffeekonsum über drei Wochen erhöhte sich die Anzahl der Bifidobacterium spp.<sup>129</sup> Bifidobacteria befördern primär anti-inflammatorische Prozesse<sup>130</sup> und wirken probiotisch durch die Produktion von SCFA.<sup>131</sup> Dieser Effekt sei jedoch primär den Polyphenolen<sup>133</sup> und nicht Koffein<sup>129,133</sup> zuzuschreiben.

Im Gegensatz dazu war eine Abnahme des dem Firmicutesstamm zugehörigen *Erysipelatoclostridium* zu beobachten.<sup>130</sup> Das *Erysipelatoclostridium* ist assoziiert mit Adipositas, der Immunantwort und Inflammation,<sup>130</sup> sodass ein vermindertes Vorkommen assoziiert sein könnte mit anti-inflammatorischen Effekten.

Während Kaffee und Koffein also teilweise ein vermehrtes Vorkommen von bestimmten Bakterienstämmen befördert, kann es auf der anderen Seite die Häufigkeit von anderen Bakterien vermindern. Wie oben bereits erwähnt konnte eine erhöhte Ratio von Firmicutes zu Bacteroidetes beobachtet werden.<sup>132</sup> In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung stehen die Ergebnisse von weiteren Studien, in denen ein vermindertes Vorkommen von Bacteroidetes unter dem Einfluss von Kaffee beschrieben wurde.<sup>119,131</sup> SFB waren ebenfalls vermindert.<sup>134</sup>

Gemischte Ergebnisse konnten für die Häufigkeit der *Lactobacillus* spp. beobachtet werden. So wurde durch Kaffee und teilweise expliziert durch Koffein ein vermehrtes Vorkommen befördert.<sup>110,129,134</sup> Im Gegensatz dazu beschreiben mehrere Arbeitsgruppen ein reduziertes Vorkommen dieser Spezies.<sup>119,131,135</sup>

Ebenfalls gemischte Resultate liefern die Untersuchungen für *Desulfovibrio*, die *Enterococcus* spp. und *Bacteroides*, mit teils Vermehrung<sup>129,131,133,136</sup> und teils Verminderung dieser Mikrobiota.<sup>110,134,137</sup> Anzumerken sei hier, dass in der Studie von *Gao et al.* koffeinhaltiger Pu-erh Tee und nicht Kaffee verwendet wurde. Somit scheinen die beobachteten Effekte nicht spezifisch für Koffein zu sein,<sup>134</sup> sondern möglicherweise eher durch ein Zusammenspiel von verschiedenen Substanzen bewirkt zu werden.

Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz von den anti-inflammatorischen Effekten von Kaffee könnte die erhöhte Produktion von SCFA sein. Zu den durch Bakterien im Rahmen der Fermentierung im proximalen Kolon produzierten SCFA<sup>122</sup> zählen Acetat, Butyrat und Propionat.<sup>113,114</sup> Sie spielen eine entscheidende Rolle in der Vermittlung der gesundheitsförderlichen Wirkung von Ballaststoffen<sup>112</sup> und dienen als Botenstoff zwischen dem intestinalen Mikrobiom und dem Immunsystem.<sup>113,138</sup> Sie tragen nicht nur im GI-Trakt zur Immunhomeostase bei sondern auch in der Lunge und den Nieren.<sup>138</sup>

Dabei wird Acetat von fast allen enteralen Mikrobiota produziert, während die Produktion von Butyrat hauptsächlich durch Firmicutes und die Produktion von Propionat durch Bacteroidetes erfolgt.<sup>113,123</sup> Butyrat vermittelt vor allem anti-inflammatorische und anti-onkogene Effekte.<sup>113,123</sup> Unter anderem ist es dazu in der Lage, die pro-inflammatorische Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-12 zu supprimieren und die Barrierefunktion von Kolonozyten zu stärken.<sup>123</sup>

## **(b) Das Mikrobiom und RA**

Umweltfaktoren spielen in der Pathogenese der RA eine wichtige Rolle. Mit Zigarettenkonsum als wichtigem beeinflussbarem Risikofaktor ist anzunehmen, dass innere Körperoberflächen und Epithelien als Kontaktfläche zur Außenwelt zur Pathogenese beitragen

können.<sup>139</sup> In präklinischen Stadien der RA konnten erhöhte Level von IgA-ACPA-AK beobachtet, was Hinweis auf eine Beteiligung des mucosalen Immunsystems ist.<sup>116,140</sup>

Dadurch stellt sich automatisch die Frage, welche Rolle nicht nur die pulmonalen Barrieren spielen, sondern auch welchen Einfluss der GI-Trakt und die Mikrobiota auf das mucosale Immunsystem in der Pathogenese und dem Krankheitsverlauf der RA hat.

Chronische Erkrankungen sind häufig mit einer Dysbiose und Inflammation assoziiert<sup>128</sup> darunter unter anderem T1DM, SLE und CED.<sup>123</sup> Postprandial kommt es bereits physiologisch zu Entzündungsvorgängen. Die Zusammensetzung der Nährstoffe hat dabei einen direkten Einfluss auf das Ausmaß dieser postprandialen Entzündung. Fermentierte Nahrung<sup>128</sup> und Lebensmittel mit einem niedrigen glykämischen Index bewirken eine CRP, IL-6 und TNF- $\alpha$  Absenkung, während eine fetthaltige Ernährung mit erhöhten IL-1, CRP und TNF- $\alpha$  Werten einhergeht.<sup>117,134</sup> Fermentierte Nahrung erhöht außerdem die Mikrobiomdiversität.<sup>128</sup>

Ein Beispiel dafür, dass Immunzellen aus dem GI-Trakt einen systemischen Effekt bei Autoimmunerkrankungen haben können, liefert die autoimmune entzündliche Kardiomyopathie, bei der im Darm aktivierte Immunzellen ins Herz wandern.<sup>118</sup> Ein weiterer Hinweis auf die systemischen Auswirkungen von ursprünglich im Darm beginnenden entzündlichen Prozessen zeigte sich in gesunden Kontrollobjekten, bei denen in PBMCs Fragmente von Darmbakterien gefunden wurden.<sup>141</sup> In RA-Patienten konnten diese Fragmente zum Teil auch in der Synovia nachgewiesen werden.<sup>141</sup>

Dass eine veränderte Mikrobiotazusammensetzung in RA-Patienten vorhanden ist, wird sowohl murin als auch im Menschen bestätigt.<sup>115-117,141-145</sup> Diese ist unter anderem gekennzeichnet durch ein vermehrtes Vorkommen von *Prevotella copri* (*P. copri*)<sup>117,140,143,144</sup> und der *Lactobacillus* spp.<sup>116,142-144</sup> Gleichzeitig zeigt ein Grossteil der vorliegenden Literatur eine Verminderung der *Bacteroides* spp.<sup>115,117,140,143,144</sup> sowie der *Bifidobacterium* spp.<sup>117,143</sup>

Die Gruppe um *Yu et al.* untersuchte das fäkale Mikrobiom von RA-Patienten und konnte dort ein erhöhtes Vorkommen von *Bacteroidetes* und *Proteobacteria* feststellen, während das Verhältnis von *Firmicutes* zu *Actinobacteria* in der gesunden Kontrollgruppe deutlich höher war.<sup>142</sup> Durch die verminderte Ratio von *Firmicutes* zu *Bacteroidetes* werden pro-inflammatorische Auswirkungen angenommen<sup>142</sup> unter anderem durch eine verminderte Differenzierung von CD4+ T-Zellen in Richtung des T<sub>reg</sub>-Subtyps.

### **(i) *P. copri* in RA**

*P. copri* ist vor allem bei Patienten im Frühstadium (new-onset RA, NORA) mit einer Dysbiose<sup>115</sup> und einer erhöhten Krankheitsaktivität assoziiert.<sup>141</sup> Außerdem besteht eine Assoziation mit einer verminderten *Bacteroides*-Anzahl.<sup>141</sup> In Mausmodellen konnte nachgewiesen werden, dass *P. copri* Arthritis auslösen kann.<sup>140</sup> Der Pathomechanismus zwischen der Vermehrung von *P. copri* und der RA bleiben weiterhin unvollständig verstanden. Mögliche Erklärungsansätze bieten die Beobachtung von erhöhten Th17-Zellraten und *in vitro*

vermehrter IFN- $\gamma$ -Produktion ausgelöst durch ein Peptid des 27-kDa P. copri Proteins, das im Synovialgewebe und in PBMCs von RA-Patienten nachgewiesen werden konnte.<sup>146</sup>

Das CIA-Mausmodell von *Jiang et al.* postuliert interessanterweise, dass eine Dysbiose mit vermehrtem Vorkommen von P. copri in Kombination mit einer ballaststoffreichen Ernährung zu einer Aggravierung der Erkrankung führt.<sup>147</sup> Interessant ist dies insofern, als dass eine ballaststoffreiche Ernährung allgemein als gesundheitsförderlich gilt.<sup>139</sup> Insgesamt gilt die Prevotella spp. in westlichen Populationen im Vergleich zu afrikanischen Vergleichsgruppen als unterrepräsentiert und ist mit einer vegetarischen Ernährung assoziiert.<sup>148</sup> Für einige Prevotella Stämme konnten anti-inflammatorische Effekte nachgewiesen werden mit einer Verbesserung der arthritischen Beschwerden.<sup>140</sup> Eine Erklärung für diese Diskrepanz könnte die Studie von *Nii et al.* liefern. Die Gruppe konnte eine spezifische Genomsequenz in P. copri aus Stuhlproben von RA-Patienten nachweisen, die in der gesunden Kontrollgruppe nicht vorhanden war und die im Mausmodell RA hervorrufen konnte. Daraus leiten sie die Hypothese ab, dass nicht P. copri per se für die RA verantwortlich sei sondern der von ihnen nachgewiesene, möglicherweise pathogene Stamm.<sup>139</sup> Somit könnte der Effekt von P. copri auch Diät-abhängig sein.<sup>148</sup>

### (i) Segmentierte Fadenbakterien (SFB) in RA

Ein weiterer wichtiger Vertreter des Mikrobioms bei RA-Patienten könnten SFB sein.<sup>115,121,149,150</sup> SFB gelten als immunstimulatorisch,<sup>149,150</sup> indem sie unter anderem die Differenzierung von verschiedenen Th-Subtypen beeinflussen darunter Th1-, Th17- und T<sub>reg</sub>-Zellen.<sup>123</sup> Außerdem fördern sie die mucosale IgA-Produktion.<sup>123</sup>

Im Mausmodell konnte eine durch SFB ausgelöste Induktion von Th17-Zellen Autoimmunarthritis hervorrufen.<sup>121</sup> Eine Differenzierung in Richtung des pro-inflammatorischen Th17-Subtyps konnte auch in der Studie von *Attur et al.* beobachtet werden.<sup>115</sup> Diese findet v.a. im Dünndarm statt.<sup>149,150</sup> Weiterhin scheinen sie die IFN- $\gamma$ -Transkripte hochzuregulieren, wodurch Bedingungen gefördert werden, die eine Differenzierung Richtung Th1-Subtyp bahnen.<sup>150</sup>

Weiterhin konnte in der Studie von *Teng et al.* eine Stimulation von Tfh-Zellen durch SFB beobachtet werden. Diese Zellen sind wiederum an der Induktion von Autoimmunarthritis im Mausmodell beteiligt.<sup>151</sup>

Somit lässt sich insgesamt annehmen, dass verschiedene Mikrobiota unterschiedliche Effekte auf die Pathogenese und den Krankheitsverlauf der RA haben und diese weiterhin abhängig von den Ernährungsgewohnheiten sind. Unter der Einnahme von Probiotika wie beispielsweise Bifidobacterium bifidum<sup>116</sup> konnte eine Verbesserung von RA-Symptomatik<sup>141</sup> und ein Absinken von Entzündungsparametern wie CRP, TNF- $\alpha$  und IL-6 beobachtet werden. Ebenfalls als symptomlindernd gilt eine mediterrane Diät. Bei RA-Patienten, die eine

mediterrane Diät für drei Monate befolgten, konnte eine Regeneration der gestörten Mikrobiotadiversität beobachtet werden.<sup>117</sup>

### **(c) Das Mikrobiom, RA und Koffein**

Bei eingeschränkter Literatur kann aktuell nur anhand der Studien, die sich mit einem Zusammenhang zwischen Koffein und dem Mikrobiom und Studien, die sich mit dem Zusammenhang von RA und dem Mikrobiom auseinandersetzen, über mögliche Interaktionen dieser drei komplexen Systeme gemutmaßt werden.

Koffein hat zum Teil ähnliche Auswirkungen auf das Mikrobiom wie sie auch bei der RA vorhanden sind. Beispielsweise konnte ein erhöhtes Vorkommen der *Lactobacillus* spp. sowohl in RA-Patienten<sup>116,143</sup> als auch durch Koffeineinfluss<sup>129</sup> beobachtet werden, was annehmen lässt, dass Koffeinkonsum bei RA-Patienten synergistisch auf die *Lactobacillus* spp. und den ihr zugeschriebenen probiotischen Effekten im Dünndarm wirken könnte.<sup>120</sup> Dies ist ebenfalls im Einklang mit der Beobachtung, dass der Firmicutes Stamm in den meisten Studien durch Koffein vermehrt ist,<sup>132,133</sup> was ebenfalls anti-inflammatorische Effekte annehmen lässt unter anderem durch Inhibition von IFN- $\gamma$  und IL-12 Sekretion durch Firmicutes.<sup>123</sup> Dadurch könnte man annehmen, dass die Th1-Antwort bei RA-Patienten unterdrückt und die Krankheitsentstehung vermindert wird.

Sowohl für Kaffee und Koffein als auch bei der RA konnten widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Anzahl von *Bacteroides* spp. verzeichnet werden.<sup>110,129,141</sup> Da für sich schon uneindeutige Ergebnisse vorliegen, bleiben mögliche Wechselwirkungen zwischen den beiden Variablen Gegenstand zukünftiger Forschungsarbeiten.

Gegenläufige Ergebnisse liegen für das Vorkommen von *Bifidobacteria* vor. Während diese als probiotisch geltende Spezies durch Kaffeekonsum gefördert wird,<sup>130,133</sup> ist sie bei RA-Patienten vermindert vorzufinden.<sup>117,143</sup> Dadurch könnte hypothetisiert werden, dass die proinflammatorischen Effekte in der RA durch Fehlen dieser Probiotika durch Kaffeekonsum gemildert werden könnte, selbst wenn dieser Effekt nicht einzig Koffein zuzuschreiben ist. Ähnliches könnte sich annehmen lassen, wenn man SFB betrachtet. Es kann aufgrund der aktuellen Studienlage davon ausgegangen werden, dass SFB arthritische Beschwerden und die Induktion von Arthritis befördern.<sup>115,121,151</sup> In einer Studie konnte durch Kaffee ein vermindertes Vorkommen von SFB beobachtet werden.<sup>134</sup> Möglicherweise könnte Kaffee somit auch zu einer Abmilderung von arthritischen Beschwerden beitragen durch die Beeinflussung der Mikrobiomzusammensetzung.

Festhalten lässt sich also, dass sowohl das Mikrobiom als auch Kaffee und nicht zuletzt die Pathogenese und der Krankheitsverlauf der RA bereits für sich sehr komplex und teils nicht vollständig verstanden sind. Somit gestaltet es sich schwierig, Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Komponenten isoliert zu untersuchen, da es ein komplexes Netzwerk aus sich gegenseitig und wechselseitig beeinflussenden Faktoren gibt. Aufgrund der aktuellen

Studienlage könnte postuliert werden, dass durch Kaffeekonsum die Veränderungen des Mikrobioms bei RA-Patienten zum Teil gemindert werden könnten. Zu diskutieren und weiter zu erforschen bleibt, ob dieser Effekt auf die Mikrobiota auf Koffein zurückzuführen ist, da nur in einer Studie ein direkter Effekt von Koffein auf Veränderungen im Mikrobiom untersucht wurde.

#### **4.2.2. Kaffee und MTX**

Neben der direkten Interaktion von Kaffee und seiner Bestandteile soll hier kurz auf eine mögliche Wechselwirkung zwischen Kaffee bzw. Koffein und MTX eingegangen werden. MTX ist trotz neuer Therapien weiterhin ein wichtiger Bestandteil in der Standardtherapie der RA.<sup>24</sup> Der genaue Wirkmechanismus von MTX ist bisher weiterhin nicht abschließend geklärt. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass es durch Hemmung der 5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-Ribonukleotid (AICAR) Transformylase zu einer Akkumulation von AICAR kommt. Diese führt wiederum zu einer Inhibition der Adenosin-desaminase, was eine Adenosin-Akkumulation und die damit einhergehenden anti-inflammatorischen Effekte von Adenosin zur Folge hat.<sup>152</sup>

Unter einem hohen Kaffeekonsum (258,5 +/- 68,6 mg/d) konnte im Vergleich zu einem geringen Kaffeekonsum (88,8 +/- 21,9 mg/d) eine verminderte Symptomverbesserung bei RA-Patienten nach Therapiestart mit MTX beobachtet werden.<sup>152</sup> Auch im murinen Modell von *Montesinos et al.* konnte die therapeutische Wirkung von MTX durch Koffein antagonisiert werden, woraus sich schließen lässt, dass eine Koffeinabstinenz bei RA-Patienten unter MTX-Therapie mit einer verbesserten Wirksamkeit einhergeht.<sup>153</sup> *Cronstein et al.* konnten nachweisen, dass durch die Adenosin-Akkumulation unter MTX die Funktion bzw. die Adhäsion von Neutrophilen Granulozyten verhindert wird, wodurch eine anti-inflammatorische Wirkung erzielt wird. Dieser Effekt wird über den A2A-AR vermittelt.<sup>154</sup>

Im Gegensatz dazu konnte in der Studie von *Benito-Garcia et al.* kein signifikanter Einfluss von Koffein auf die MTX-Effektivität beobachtet werden, jedoch werden auch hier höhere *DAS28-Score*-Werte und vermehrte Gelenkschwellung in der mit Koffein behandelten Gruppe beschrieben.<sup>155</sup>

Kurz sei hier auch auf die Beobachtung verwiesen, dass eine bei der RA beobachtete Dysbiose sich nach dem Therapiestart mit DMARDs verbessert.<sup>140</sup> Der Metabolismus von Medikamenten wird auch durch das Mikrobiom beeinflusst z.B. MTX oder Sulfasalazin.<sup>116</sup>

#### **4.3. Schlussfolgerung**

Die Pathogenese und der Krankheitsverlauf der RA sind für sich genommen komplexe und weiterhin unvollständig verstandene Prozesse, die durch viele interne und externe Faktoren beeinflusst werden.<sup>9</sup> Ähnlich verhält es sich für das weltweit verbreitete Getränk Kaffee.<sup>13</sup> Dabei machen Koffein und die in dieser Arbeit nur kurz angerissenen Polyphenole

nur einen Bruchteil der molekularen Substanzen aus, aus denen Kaffee sich zusammensetzt.<sup>73</sup> Weiter verkompliziert wird die Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen Kaffee und Koffein und der RA zum einen dadurch, dass die biochemische Zusammensetzung von Kaffee nicht einheitlich ist und sich beispielsweise durch den Röstvorgang und die Zubereitungsmethode ändert.<sup>110</sup> Zum anderen bestehen interindividuelle Unterschiede in der Metabolisierung von Kaffee und Koffein,<sup>77</sup> sodass sich nur schwer einheitliche Aussagen über die Wirkung von Koffein auf das einzelne Individuum treffen lassen.

Weiterhin sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass Kaffee zum Teil durch die Mikrobiota im GI-Trakt verstoffwechselt<sup>119</sup> wird und diese einen Einfluss auf das systemische Immunsystem nehmen können.<sup>118,141</sup> Somit entsteht ein komplexes Netz aus verschiedenen Faktoren, die sich wechselseitig und teils gegenläufig beeinflussen und die es bei der Aus- und Bewertung dieser Arbeit zu beachten gilt.

In dieser Arbeit konnte unter dem Einfluss von Koffein eine erhöhte Produktion des pro-inflammatorischen IFN- $\gamma$  in Th1-Zellen von RA-Patienten beobachtet werden. Ein möglicher Erklärungsansatz für die der aktuellen wissenschaftlichen Auffassung von Koffein als anti-inflammatorischer Substanz widersprechenden Ergebnisse bietet die in dieser Studie untersuchte Vermittlung der Koffeinwirkung als Adenosin-Antagonist über den A2A-AR. Ob Koffein unter physiologischen Bedingungen im Mausmodell oder auch im Menschen ebenfalls Auswirkungen auf die IFN- $\gamma$ -Produktion und somit potenziell auf inflammatorische Vorgänge und den Krankheitsverlauf von RA-Patienten haben könnte, bleibt aufgrund der oben erwähnten komplexen Zusammenhänge schwer einzuschätzen.

Es lässt sich festhalten, dass die beobachtete pro-inflammatorische Wirkung von Koffein einen möglichen zellulären bzw. molekularen Erklärungsansatz für die in Kohortenstudien erhobenen Ergebnisse, dass ein hoher Kaffeekonsum > 4 Tassen pro Tag mit einem schlechteren Krankheitsverlauf der RA assoziiert ist,<sup>65,67,111</sup> bieten könnte. Ob eine Übertragung der *in vitro* Beobachtungen auf die *in vivo* Situation möglich ist, inwieweit andere Kaffeebestandteile diese Wirkung beeinflussen und welche Rolle das Mikrobiom dabei spielt, lassen sich im Rahmen dieser Arbeit nur spekulativ anhand der aktuell eingeschränkten Literatur behandeln und bleiben somit Gegenstand von zukünftiger Forschung.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Smith DA, Germolec DR. Introduction to immunology and autoimmunity. *Environ Health Perspect* 1999; **107** Suppl 5(Suppl 5): 661-5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1566249/pdf/envhper00522-0014.pdf> (Zuletzt abgerufen am 01.01.2024)
2. Wang L, Wang FS, Gershwin ME. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *J Intern Med* 2015; **278**(4): 369-95. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/joim.12395> (Zuletzt abgerufen am 01.01.2024)
3. Lerner A, Jeremias P, Matthias T. The World Incidence and Prevalence of Autoimmune Diseases is Increasing. *International Journal of Celiac Disease* 2015; **3**(4): 151-5. <https://pubs.sciepub.com/ijcd/3/4/8/> (Zuletzt abgerufen am 28.06.2024)
4. Li Y, Yang W, Wang F. The relationship of blood CDC42 level with Th1 cells, Th17 cells, inflammation markers, disease risk/activity, and treatment efficacy of rheumatoid arthritis. *Ir J Med Sci* 2022; **191**(5): 2155-61. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9492614/pdf/11845\\_2021\\_Article\\_2858.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9492614/pdf/11845_2021_Article_2858.pdf) (Zuletzt abgerufen am 28.06.2024)
5. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2016; **388**(10055): 2023-38. [https://core.ac.uk/reader/77600864?utm\\_source=linkout](https://core.ac.uk/reader/77600864?utm_source=linkout) (Zuletzt abgerufen am 28.06.2024)
6. Mueller AL, Payandeh Z, Mohammadkhani N, et al. Recent Advances in Understanding the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis: New Treatment Strategies. *Cells* 2021; **10**(11). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8616543/> (Zuletzt abgerufen am 28.06.2024)
7. Kugyelka R, Kohl Z, Olasz K, et al. Enigma of IL-17 and Th17 Cells in Rheumatoid Arthritis and in Autoimmune Animal Models of Arthritis. *Mediators Inflamm* 2016; **2016**: 6145810. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4745575/pdf/MI2016-6145810.pdf> (Zuletzt abgerufen am 28.06.2024)
8. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003; **423**(6937): 356-61. <https://www.nature.com/articles/nature01661> (Zuletzt abgerufen am 28.06.2024)
9. Firestein GS, McInnes IB. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity* 2017; **46**(2): 183-96. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5385708/pdf/nihms850134.pdf> (Zuletzt abgerufen am 28.06.2024)
10. Pedersen M, Stripp C, Klarlund M, Olsen SF, Tjonneland AM, Frisch M. Diet and risk of rheumatoid arthritis in a prospective cohort. *J Rheumatol* 2005; **32**(7): 1249-52. <https://www.jrheum.org/content/32/7/1249.long> (Zuletzt abgerufen am 28.06.2024)
11. Pattison DJ, Symmons DP, Young A. Does diet have a role in the aetiology of rheumatoid arthritis? *Proc Nutr Soc* 2004; **63**(1): 137-43. <https://www.cambridge.org/core/services/aop-cambridge-core/content/view/0A27BF7D74353098C7CF171149F211AB/S0029665104000151a.pdf/does-diet-have-a-role-in-the-aetiology-of-rheumatoid-arthritis.pdf> (Zuletzt abgerufen am 28.06.2024)
12. Dey M, Cutolo M, Nikiphorou E. Beverages in Rheumatoid Arthritis: What to Prefer or to Avoid. *Nutrients* 2020; **12**(10). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7602656/pdf/nutrients-12-03155.pdf> (Zuletzt abgerufen am 28.06.2024)
13. Sharif K, Watad A, Bragazzi NL, Adawi M, Amital H, Shoenfeld Y. Coffee and autoimmunity: More than a mere hot beverage! *Autoimmun Rev* 2017; **16**(7): 712-21. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1568997217301271?via%3Dihub> (Zuletzt abgerufen am 28.06.2024)
14. Lee YH, Bae SC, Song GG. Coffee or tea consumption and the risk of rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Clin Rheumatol* 2014; **33**(11): 1575-83. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10067-014-2631-1> (Zuletzt abgerufen am 28.06.2024)

15. Petrelli F, Mariani FM, Alunno A, Puxeddu I. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: one year in review 2022. *Clin Exp Rheumatol* 2022; **40**(3): 475-82. <https://www.clinexprheumatol.org/abstract.asp?a=18523> (Zuletzt abgerufen am 28.06.2024)
16. Niu Q, Cai B, Huang ZC, Shi YY, Wang LL. Disturbed Th17/Treg balance in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2012; **32**(9): 2731-6. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00296-011-1984-x> (Zuletzt abgerufen am 28.06.2024)
17. Chemin K, Gerstner C, Malmstrom V. Effector Functions of CD4+ T Cells at the Site of Local Autoimmune Inflammation-Lessons From Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol* 2019; **10**: 353. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6422991/pdf/fimmu-10-00353.pdf> (Zuletzt abgerufen am 28.06.2024)
18. Alunno A, Manetti M, Caterbi S, et al. Altered immunoregulation in rheumatoid arthritis: the role of regulatory T cells and proinflammatory Th17 cells and therapeutic implications. *Mediators Inflamm* 2015; **2015**: 751793. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4397010/pdf/MI2015-751793.pdf> (Zuletzt abgerufen am 28.06.2024)
19. Taylor PC. Update on the diagnosis and management of early rheumatoid arthritis. *Clin Med (Lond)* 2020; **20**(6): 561-4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7687323/pdf/clinmed-20-6-561.pdf> (Zuletzt abgerufen am 28.06.2024)
20. Barber MRW, Drenkard C, Falasinnu T, et al. Global epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol* 2021; **17**(9): 515-32. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8982275/pdf/nihms-1780632.pdf> (Zuletzt abgerufen am 28.06.2024)
21. Hedin CRH, Sonkoly E, Eberhardson M, Stahle M. Inflammatory bowel disease and psoriasis: modernizing the multidisciplinary approach. *J Intern Med* 2021; **290**(2): 257-78. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/joim.13282> (Zuletzt abgerufen am 28.06.2024)
22. Yamout BI, Alroughani R. Multiple Sclerosis. *Semin Neurol* 2018; **38**(2): 212-25. [https://core.ac.uk/reader/1813321?utm\\_source=linkout](https://core.ac.uk/reader/1813321?utm_source=linkout) (Zuletzt abgerufen am 28.06.2024)
23. Mobasser M, Shirmohammadi M, Amiri T, Vahed N, Hosseini Fard H, Ghojzadeh M. Prevalence and incidence of type 1 diabetes in the world: a systematic review and meta-analysis. *Health Promot Perspect* 2020; **10**(2): 98-115. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7146037/pdf/hpp-10-98.pdf> (Zuletzt abgerufen am 28.06.2024)
24. Herold G. Innere Medizin // Innere Medizin 2020. Köln: Herold, Gerd; 2020.
25. Li G, Kolan SS, Guo S, et al. Activated, Pro-Inflammatory Th1, Th17, and Memory CD4+ T Cells and B Cells Are Involved in Delayed-Type Hypersensitivity Arthritis (DTHA) Inflammation and Paw Swelling in Mice. *Front Immunol* 2021; **12**: 689057. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8365304/pdf/fimmu-12-689057.pdf> (Zuletzt abgerufen am 28.06.2024)
26. R. GC. Citrullination: A Target for Disease Intervention in Multiple Sclerosis and other Inflammatory Diseases? *J Clin Immunol* 2013. <https://www.longdom.org/open-access/citrullination-a-target-for-disease-intervention-in-multiple-sclerosis-and-other-inflammatory-diseases-2155-9899.1000146.pdf> (zuletzt abgerufen am 07.07.2024)
27. Rantapaa-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; **48**(10): 2741-9. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/art.11223> (zuletzt abgerufen am 03.07.2024)
28. Ciesielski O, Biesiekierska M, Panthu B, Soszynski M, Pirola L, Balcerzyk A. Citrullination in the pathology of inflammatory and autoimmune disorders: recent advances and future perspectives. *Cell Mol Life Sci* 2022; **79**(2): 94. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8788905/pdf/18\\_2022\\_Article\\_4126.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8788905/pdf/18_2022_Article_4126.pdf) (zuletzt abgerufen am 03.07.2024)

29. Luque-Campos N, Contreras-Lopez RA, Jose Paredes-Martinez M, et al. Mesenchymal Stem Cells Improve Rheumatoid Arthritis Progression by Controlling Memory T Cell Response. *Front Immunol* 2019; **10**: 798. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6477064/pdf/fimmu-10-00798.pdf> (zuletzt abgerufen am 03.07.2024)
30. Timmermans S, Souffriau J, Libert C. A General Introduction to Glucocorticoid Biology. *Front Immunol* 2019; **10**: 1545. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6621919/pdf/fimmu-10-01545.pdf> (zuletzt abgerufen am 03.07.2024)
31. Williams DM. Clinical Pharmacology of Corticosteroids. *Respir Care* 2018; **63**(6): 655-70. <https://rc.rcjournal.com/content/63/6/655/tab-pdf> (zuletzt abgerufen am 03.07.2024)
32. McInnes IB, Schett G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet* 2017; **389**(10086): 2328-37. [https://core.ac.uk/reader/189421541?utm\\_source=linkout](https://core.ac.uk/reader/189421541?utm_source=linkout) (zuletzt abgerufen am 03.07.2024)
33. Muller-Ladner U, Ospelt C, Gay S, Distler O, Pap T. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* 2007; **9**(6): 223. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2246247/pdf/ar2337.pdf> (zuletzt abgerufen am 03.07.2024)
34. Zrioual S, Ecochard R, Tournadre A, Lenief V, Cazalis MA, Miossec P. Genome-wide comparison between IL-17A- and IL-17F-induced effects in human rheumatoid arthritis synoviocytes. *J Immunol* 2009; **182**(5): 3112-20. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19234208/> (zuletzt abgerufen am 03.07.2024)
35. Luo P, Wang P, Xu J, et al. Immunomodulatory role of T helper cells in rheumatoid arthritis : a comprehensive research review. *Bone Joint Res* 2022; **11**(7): 426-38. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9350707/pdf/BJR-11-426.pdf> (zuletzt abgerufen am 03.07.2024)
36. Poole AR, Kobayashi M, Yasuda T, et al. Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2002; **61 Suppl 2**(Suppl 2): ii78-81. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1766700/pdf/v061p0ii78.pdf> (zuletzt abgerufen am 03.07.2024)
37. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008; **8**(12): 958-69. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2724991/pdf/nihms84393.pdf> (zuletzt abgerufen am 03.07.2024)
38. Prajzlerova K, Krystufkova O, Komarc M, et al. The dysregulation of monocyte subpopulations in individuals at risk of developing rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2021; **60**(4): 1823-31. <https://academic.oup.com/rheumatology/article/60/4/1823/5942938> (zuletzt abgerufen am 03.07.2024)
39. Kawanaka N, Yamamura M, Aita T, et al. CD14+,CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; **46**(10): 2578-86. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/art.10545> (zuletzt abgerufen am 03.07.2024)
40. Rossol M, Kraus S, Pierer M, Baerwald C, Wagner U. The CD14(bright) CD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis Rheum* 2012; **64**(3): 671-7. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/art.33418> (zuletzt abgerufen am 03.07.2024)
41. Simon Q, Grasseau A, Boudigou M, et al. A Proinflammatory Cytokine Network Profile in Th1/Type 1 Effector B Cells Delineates a Common Group of Patients in Four Systemic Autoimmune Diseases. *Arthritis Rheumatol* 2021; **73**(8): 1550-61. <https://acrjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/art.41697> (zuletzt abgerufen am 03.07.2024)
42. Nakayama T, Yoshimura M, Higashioka K, et al. Type 1 helper T cells generate CXCL9/10-producing T-bet(+) effector B cells potentially involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Cell Immunol* 2021; **360**: 104263. [https://catalog.lib.kyushu-u.ac.jp/opac\\_download\\_md/4475035/med3481.pdf](https://catalog.lib.kyushu-u.ac.jp/opac_download_md/4475035/med3481.pdf) (zuletzt abgerufen am 03.07.2024)

43. Lee EY, Lee ZH, Song YW. The interaction between CXCL10 and cytokines in chronic inflammatory arthritis. *Autoimmun Rev* 2013; **12**(5): 554-7. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1568997212002467> (zuletzt abgerufen am 03.07.2024)
44. Paparo SR. Rheumatoid arthritis and the Th1 chemokine MIG. *Clin Ter* 2019; **170**(6): e472-e7. [http://www.clinicaterapeutica.it/2019/170/6/12\\_PAPARO.pdf](http://www.clinicaterapeutica.it/2019/170/6/12_PAPARO.pdf) (zuletzt abgerufen am 03.07.2024)
45. Kuan WP, Tam LS, Wong CK, et al. CXCL 9 and CXCL 10 as Sensitive markers of disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2010; **37**(2): 257-64. <https://www.jrheum.org/content/37/2/257.long> (zuletzt abgerufen am 03.07.2024)
46. Aldridge J, Ekwall AH, Mark L, et al. T helper cells in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis primarily have a Th1 and a CXCR3(+)Th2 phenotype. *Arthritis Res Ther* 2020; **22**(1): 245. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7566124/pdf/13075\\_2020\\_Article\\_2349.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7566124/pdf/13075_2020_Article_2349.pdf) (zuletzt abgerufen am 03.07.2024)
47. Cho BA, Sim JH, Park JA, et al. Characterization of effector memory CD8+ T cells in the synovial fluid of rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol* 2012; **32**(4): 709-20. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10875-012-9674-3> (zuletzt abgerufen am 03.07.2024)
48. Vitales-Noyola M, Hernandez-Castro B, Alvarado-Hernandez D, et al. Levels of Pathogenic Th17 and Th22 Cells in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J Immunol Res* 2022; **2022**: 5398743. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9392632/pdf/JIR2022-5398743.pdf> (zuletzt abgerufen am 03.07.2024)
49. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; **136**(7): 2348-57. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2419430/> (zuletzt abgerufen am 03.07.2024)
50. Romagnani S. Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. *Immunol Today* 1991; **12**(8): 256-7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1680337/> (zuletzt abgerufen am 03.07.2024)
51. Dolhain RJ, van der Heiden AN, ter Haar NT, Breedveld FC, Miltenburg AM. Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996; **39**(12): 1961-9. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/art.1780391204> (zuletzt abgerufen am 03.07.2024)
52. Miltenburg AM, van Laar JM, de Kuiper R, Daha MR, Breedveld FC. T cells cloned from human rheumatoid synovial membrane functionally represent the Th1 subset. *Scand J Immunol* 1992; **35**(5): 603-10. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-3083.1992.tb03260.x> (zuletzt abgerufen am 03.07.2024)
53. James EA, Rieck M, Pieper J, et al. Citrulline-specific Th1 cells are increased in rheumatoid arthritis and their frequency is influenced by disease duration and therapy. *Arthritis Rheumatol* 2014; **66**(7): 1712-22. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4248674/pdf/nihms602677.pdf> (zuletzt abgerufen am 03.07.2024)
54. Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 1998; **187**(6): 875-83. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2212187/pdf/97-1974.pdf> (zuletzt abgerufen am 03.07.2024)
55. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000; **100**(6): 655-69. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867400807023?via%3Dihub> (zuletzt abgerufen am 03.07.2024)
56. Pollard KM, Cauvi DM, Toomey CB, Morris KV, Kono DH. Interferon-gamma and systemic autoimmunity. *Discov Med* 2013; **16**(87): 123-31. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3934799/pdf/nihms555888.pdf> (zuletzt abgerufen am 03.09.2024)

57. Lee SK, Silva DG, Martin JL, et al. Interferon-gamma excess leads to pathogenic accumulation of follicular helper T cells and germinal centers. *Immunity* 2012; **37**(5): 880-92. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761312004712?via%3Dihub> (zuletzt abgerufen am 03.07.2024)
58. Kak G, Raza M, Tiwari BK. Interferon-gamma (IFN-gamma): Exploring its implications in infectious diseases. *Biomol Concepts* 2018; **9**(1): 64-79. <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/bmc-2018-0007/html> (zuletzt abgerufen am 03.07.2024)
59. Negishi H, Taniguchi T, Yanai H. The Interferon (IFN) Class of Cytokines and the IFN Regulatory Factor (IRF) Transcription Factor Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2018; **10**(11). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6211389/pdf/cshperspect-CYT-a028423.pdf> (zuletzt abgerufen am 03.07.2024)
60. Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, et al. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity* 1995; **3**(6): 811-21. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/1074761395900705?via%3Dihub> (zuletzt abgerufen am 03.07.2024)
61. Behrens F, Himsel A, Rehart S, et al. Imbalance in distribution of functional autologous regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007; **66**(9): 1151-6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1955165/pdf/1151.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
62. Zhang R, Miao J, Zhang K, et al. Th1-Like Treg Cells Are Increased But Deficient in Function in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol* 2022; **13**: 863753. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9114761/pdf/fimmu-13-863753.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
63. Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, Lipsky PE. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood* 2006; **108**(1): 253-61. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1895836/?report=reader> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
64. Mikuls TR, Cerhan JR, Criswell LA, et al. Coffee, tea, and caffeine consumption and risk of rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study. *Arthritis Rheum* 2002; **46**(1): 83-91. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/1529-0131%28200201%2946%3A1%3C83%3A%3AAID-ART10042%3E3.0.CO%3B2-D> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
65. Heliovaara M, Aho K, Knekt P, Impivaara O, Reunanen A, Aromaa A. Coffee consumption, rheumatoid factor, and the risk of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2000; **59**(8): 631-5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1753204/pdf/v059p00631.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
66. Lahiri M, Morgan C, Symmons DP, Bruce IN. Modifiable risk factors for RA: prevention, better than cure? *Rheumatology (Oxford)* 2012; **51**(3): 499-512. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3281496/pdf/ker299.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
67. Pedersen M, Jacobsen S, Klarlund M, et al. Environmental risk factors differ between rheumatoid arthritis with and without auto-antibodies against cyclic citrullinated peptides. *Arthritis Res Ther* 2006; **8**(4): R133. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1779386/pdf/ar2022.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
68. Mazzucca CB, Scotti L, Cappellano G, Barone-Adesi F, Chiochetti A. Nutrition and Rheumatoid Arthritis Onset: A Prospective Analysis Using the UK Biobank. *Nutrients* 2022; **14**(8). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9025922/pdf/nutrients-14-01554.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
69. Symmons DP, Bankhead CR, Harrison BJ, et al. Blood transfusion, smoking, and obesity as risk factors for the development of rheumatoid arthritis: results from a primary care-based incident case-control study in Norfolk, England. *Arthritis Rheum* 1997; **40**(11): 1955-61. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/art.1780401106> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)

70. Cutolo M, Nikiphorou E. Nutrition and Diet in Rheumatoid Arthritis. *Nutrients* 2022; **14**(4). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8878187/pdf/nutrients-14-00888.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
71. Li J, Guasch-Ferre M, Chung W, et al. The Mediterranean diet, plasma metabolome, and cardiovascular disease risk. *Eur Heart J* 2020; **41**(28): 2645-56. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7377580/pdf/ehaa209.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
72. Letarouilly JG, Sanchez P, Nguyen Y, et al. Efficacy of Spice Supplementation in Rheumatoid Arthritis: A Systematic Literature Review. *Nutrients* 2020; **12**(12). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7764619/pdf/nutrients-12-03800.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
73. Herden L, Weissert R. The Impact of Coffee and Caffeine on Multiple Sclerosis Compared to Other Neurodegenerative Diseases. *Front Nutr* 2018; **5**: 133. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6308803/pdf/fnut-05-00133.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
74. Sc Y, Muralidhara. Beneficial Role of Coffee and Caffeine in Neurodegenerative Diseases: A Minireview. *AIMS Public Health* 2016; **3**(2): 407-22. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5690364/pdf/publichealth-03-02-407.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
75. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2010; **2**(12): 1231-46. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3257627/pdf/nutrients-02-01231.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
76. Horrigan LA, Kelly JP, Connor TJ. Immunomodulatory effects of caffeine: friend or foe? *Pharmacol Ther* 2006; **111**(3): 877-92. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16540173/> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
77. Nehlig A. Interindividual Differences in Caffeine Metabolism and Factors Driving Caffeine Consumption. *Pharmacol Rev* 2018; **70**(2): 384-411. <https://pharmrev.aspetjournals.org/content/pharmrev/70/2/384.full.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
78. WALKER M. Why we sleep. The new science of sleep and dreams: PENGUIN Books; 2018.
79. Scientific Opinion on the safety of caffeine. *EFS2* 2015. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2015.4102> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
80. Varani K, Portaluppi F, Gessi S, et al. Caffeine intake induces an alteration in human neutrophil A2A adenosine receptors. *Cell Mol Life Sci* 2005; **62**(19-20): 2350-8. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-005-5312-z#preview> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
81. Yang A, Palmer AA, de Wit H. Genetics of caffeine consumption and responses to caffeine. *Psychopharmacology (Berl)* 2010; **211**(3): 245-57. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4242593/pdf/nihms643505.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
82. Johansson B, Georgiev V, Kuosmanen T, Fredholm BB. Long-term treatment with some methylxanthines decreases the susceptibility to bicuculline- and pentylentetrazol-induced seizures in mice. Relationship to c-fos expression and receptor binding. *Eur J Neurosci* 1996; **8**(12): 2447-58. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1460-9568.1996.tb01539.x> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
83. Sheth S, Brito R, Mukherjea D, Rybak LP, Ramkumar V. Adenosine receptors: expression, function and regulation. *Int J Mol Sci* 2014; **15**(2): 2024-52. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3958836/pdf/ijms-15-02024.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
84. McColl SR, St-Onge M, Dussault AA, et al. Immunomodulatory impact of the A2A adenosine receptor on the profile of chemokines produced by neutrophils. *FASEB J* 2006; **20**(1): 187-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2881301/pdf/nihms299.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)

85. Ohta A, Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 2001; **414**(6866): 916-20. <https://www.nature.com/articles/414916a> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
86. Cronstein BN, Sitkovsky M. Adenosine and adenosine receptors in the pathogenesis and treatment of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2017; **13**(1): 41-51. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5173391/pdf/nihms-826929.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
87. Cronstein BN, Naime D, Ostad E. The antiinflammatory mechanism of methotrexate. Increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation. *J Clin Invest* 1993; **92**(6): 2675-82. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC288465/pdf/jcinvest00044-0123.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
88. Linden J. Regulation of leukocyte function by adenosine receptors. *Adv Pharmacol* 2011; **61**: 95-114. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4211873/pdf/nihms513813.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
89. Eigler A, Greten TF, Sinha B, Haslberger C, Sullivan GW, Endres S. Endogenous adenosine curtails lipopolysaccharide-stimulated tumour necrosis factor synthesis. *Scand J Immunol* 1997; **45**(2): 132-9. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.1365-3083.1997.d01-377.x> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
90. Sajjadi FG, Takabayashi K, Foster AC, Domingo RC, Firestein GS. Inhibition of TNF- $\alpha$  expression by adenosine: role of A3 adenosine receptors. *J Immunol* 1996; **156**(9): 3435-42. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8617970/> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
91. Hasko G, Nemeth ZH, Vizi ES, Salzman AL, Szabo C. An agonist of adenosine A3 receptors decreases interleukin-12 and interferon-gamma production and prevents lethality in endotoxemic mice. *Eur J Pharmacol* 1998; **358**(3): 261-8. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9822893/> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
92. Link AA, Kino T, Worth JA, et al. Ligand-activation of the adenosine A2a receptors inhibits IL-12 production by human monocytes. *J Immunol* 2000; **164**(1): 436-42. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10605040/> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
93. Souness JE, Aldous D, Sargent C. Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of cyclic AMP phosphodiesterase (PDE) type 4 inhibitors. *Immunopharmacology* 2000; **47**(2-3): 127-62. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10878287/> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
94. Rosenthal LA, Taub DD, Moors MA, Blank KJ. Methylxanthine-induced inhibition of the antigen- and superantigen-specific activation of T and B lymphocytes. *Immunopharmacology* 1992; **24**(3): 203-17. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/016231099290076O?via%3Dihub> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
95. Gottwalt B, P. T. Methylxanthines. *StatPearls* 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559165/> (zuletzt abgerufen am 07.07.2024)
96. Ritter M, Hohenberger K, Alter P, Herzum M, Tebbe J, Maisch M. Caffeine inhibits cytokine expression in lymphocytes. *Cytokine* 2005; **30**(4): 177-81. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1043466605000311?via%3Dihub> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
97. Tauler P, Martinez S, Martinez P, Lozano L, Moreno C, Aguilo A. Effects of Caffeine Supplementation on Plasma and Blood Mononuclear Cell Interleukin-10 Levels After Exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2016; **26**(1): 8-16. <https://journals.humankinetics.com/view/journals/ijsnem/26/1/article-p8.xml> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
98. Bravi F, Bosetti C, Tavani A, Gallus S, La Vecchia C. Coffee reduces risk for hepatocellular carcinoma: an updated meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; **11**(11): 1413-21 e1. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1542356513006095?via%3Dihub> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
99. Sartini M, Bragazzi NL, Spagnolo AM, et al. Coffee Consumption and Risk of Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Studies. *Nutrients* 2019;

- 11(3). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6471028/pdf/nutrients-11-00694.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
100. Kiyohara C, Washio M, Horiuchi T, et al. Modifying effect of N-acetyltransferase 2 genotype on the association between systemic lupus erythematosus and consumption of alcohol and caffeine-rich beverages. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2014; **66**(7): 1048-56. <https://acrjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/acr.22282> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
101. Iriverenti P, Gupta NV, Osmani RAM, Balamuralidhara V. Design & development of nanosponge loaded topical gel of curcumin and caffeine mixture for augmented treatment of psoriasis. *Daru* 2020; **28**(2): 489-506. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7704870/pdf/40199\\_2020\\_Article\\_352.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7704870/pdf/40199_2020_Article_352.pdf) (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
102. Karlson EW, Mandl LA, Aweh GN, Grodstein F. Coffee consumption and risk of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; **48**(11): 3055-60. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/art.11306> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
103. Kim SG, Kang JW, Jeong SM, Song GG, Choi SJ, Jung JH. Is Rheumatoid Arthritis Related to Coffee Consumption in Korea? A Nationwide Cross-Sectional Observational Study. *Int J Environ Res Public Health* 2021; **18**(15). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8345539/pdf/ijerph-18-07880.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
104. Lamichhane D, Collins C, Constantinescu F, et al. Coffee and Tea Consumption in Relation to Risk of Rheumatoid Arthritis in the Women's Health Initiative Observational Cohort. *J Clin Rheumatol* 2019; **25**(3): 127-32. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6195489/pdf/nihms942861.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
105. Pu B, Gu P, Zheng C, Ma L, Zheng X, Zeng Z. Self-reported and genetically predicted effects of coffee intake on rheumatoid arthritis: Epidemiological studies and Mendelian randomization analysis. *Front Nutr* 2022; **9**: 926190. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9510978/pdf/fnut-09-926190.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
106. Westerlind H, Dukuzimana J, Lu X, Alfredsson L, Klareskog L, Di Giuseppe D. Investigation of the association between coffee and risk of RA-results from the Swedish EIRA study. *Arthritis Res Ther* 2022; **24**(1): 178. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9317433/pdf/13075\\_2022\\_Article\\_2862.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9317433/pdf/13075_2022_Article_2862.pdf) (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
107. Asoudeh F, Dashti F, Jayedi A, Hemmati A, Fadel A, Mohammadi H. Caffeine, Coffee, Tea and Risk of Rheumatoid Arthritis: Systematic Review and Dose-Response Meta-analysis of Prospective Cohort Studies. *Front Nutr* 2022; **9**: 822557. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8866764/pdf/fnut-09-822557.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
108. Gloyer L, Golumba-Nagy V, Meyer A, et al. Adenosine receptor A2a blockade by caffeine increases IFN-gamma production in Th1 cells from patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2022; **51**(4): 279-83. <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/03009742.2021.1995956?needAccess=true> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
109. Wald A, Back C, Bayless TM. Effect of caffeine on the human small intestine. *Gastroenterology* 1976; **71**(5): 738-42. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/964567/> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
110. Iriondo-DeHond A, Uranga JA, Del Castillo MD, Abalo R. Effects of Coffee and Its Components on the Gastrointestinal Tract and the Brain-Gut Axis. *Nutrients* 2020; **13**(1). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7824117/pdf/nutrients-13-00088.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
111. Ascione S, Barde F, Artaud F, et al. Association between beverage consumption and risk of rheumatoid arthritis: a prospective study from the French E3N Cohort. *Rheumatology (Oxford)* 2023; **62**(5): 1814-23.

- <https://academic.oup.com/rheumatology/article/62/5/1814/6731941?login=true> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
112. Sivaprakasam S, Prasad PD, Singh N. Benefits of short-chain fatty acids and their receptors in inflammation and carcinogenesis. *Pharmacol Ther* 2016; **164**: 144-51. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4942363/pdf/nihms-784331.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
113. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J* 2017; **474**(11): 1823-36. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5433529/pdf/BCJ-2016-0510C.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
114. Sonnenburg ED, Sonnenburg JL. Starving our microbial self: the deleterious consequences of a diet deficient in microbiota-accessible carbohydrates. *Cell Metab* 2014; **20**(5): 779-86. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4896489/pdf/nihms-616789.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
115. Attur M, Scher JU, Abramson SB, Attur M. Role of Intestinal Dysbiosis and Nutrition in Rheumatoid Arthritis. *Cells* 2022; **11**(15). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9368368/pdf/cells-11-02436.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
116. Dourado E, Ferro M, Sousa Guerreiro C, Fonseca JE. Diet as a Modulator of Intestinal Microbiota in Rheumatoid Arthritis. *Nutrients* 2020; **12**(11). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7696404/pdf/nutrients-12-03504.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
117. Gioia C, Lucchino B, Tarsitano MG, Iannuccelli C, Di Franco M. Dietary Habits and Nutrition in Rheumatoid Arthritis: Can Diet Influence Disease Development and Clinical Manifestations? *Nutrients* 2020; **12**(5). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7284442/pdf/nutrients-12-01456.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
118. Zafar H, Saier MH, Jr. Gut Bacteroides species in health and disease. *Gut Microbes* 2021; **13**(1): 1-20. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7872030/pdf/KGMI\\_13\\_1848158.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7872030/pdf/KGMI_13_1848158.pdf) (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
119. Farag MA, von Bergen M, Saleh BM, Homsy MN, Abd El-AI MS. How do green and black coffee brews and bioactive interaction with gut microbiome affect its health outcomes? Mining evidence from mechanistic studies, metagenomics and clinical trials. *Trends in Food Science & Technology* 2021; **118**: 920-37. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S092422442100604X?via%3Dihub> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
120. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* 2015; **21**(29): 8787-803. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4528021/pdf/WJG-21-8787.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
121. Vieira SM, Pagovich OE, Kriegel MA. Diet, microbiota and autoimmune diseases. *Lupus* 2014; **23**(6): 518-26. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4009622/pdf/nihms-509569.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
122. Tan J, McKenzie C, Potamitis M, Thorburn AN, Mackay CR, Macia L. The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Adv Immunol* 2014; **121**: 91-119. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128001004000039?via%3Dihub> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
123. Lin L, Zhang J. Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. *BMC Immunol* 2017; **18**(1): 2. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5219689/pdf/12865\\_2016\\_Article\\_187.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5219689/pdf/12865_2016_Article_187.pdf) (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
124. Satti M, Modesto M, Endo A, Kawashima T, Mattarelli P, Arita M. Host-Diet Effect on the Metabolism of Bifidobacterium. *Genes (Basel)* 2021; **12**(4). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8074910/pdf/genes-12-00609.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)

125. Xiao Y, Zhao J, Zhang H, Zhai Q, Chen W. Mining Lactobacillus and Bifidobacterium for organisms with long-term gut colonization potential. *Clin Nutr* 2020; **39**(5): 1315-23. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0261561419302250?via%3Dihub> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
126. Sun Y, Zhang S, Nie Q, et al. Gut firmicutes: Relationship with dietary fiber and role in host homeostasis. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2023; **63**(33): 12073-88. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2022.2098249> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
127. Magne F, Gotteland M, Gauthier L, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? *Nutrients* 2020; **12**(5). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7285218/pdf/nutrients-12-01474.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
128. Wastyk HC, Fragiadakis GK, Perelman D, et al. Gut-microbiota-targeted diets modulate human immune status. *Cell* 2021; **184**(16): 4137-53 e14. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9020749/pdf/nihms-1722178.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
129. Nehlig A. Effects of Coffee on the Gastro-Intestinal Tract: A Narrative Review and Literature Update. *Nutrients* 2022; **14**(2). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8778943/pdf/nutrients-14-00399.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
130. Dai A, Hoffman K, Xu AA, et al. The Association between Caffeine Intake and the Colonic Mucosa-Associated Gut Microbiota in Humans-A Preliminary Investigation. *Nutrients* 2023; **15**(7). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10096519/pdf/nutrients-15-01747.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
131. Chen L, Wang XJ, Chen JX, et al. Caffeine ameliorates the metabolic syndrome in diet-induced obese mice through regulating the gut microbiota and serum metabolism. *Diabetol Metab Syndr* 2023; **15**(1): 37. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9996965/pdf/13098\\_2023\\_Article\\_993.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9996965/pdf/13098_2023_Article_993.pdf) (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
132. Zhu MZ, Zhou F, Ouyang J, et al. Combined use of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and caffeine in low doses exhibits marked anti-obesity synergy through regulation of gut microbiota and bile acid metabolism. *Food Funct* 2021; **12**(9): 4105-16. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2021/FO/D0FO01768J> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
133. Kolb H, Kempf K, Martin S. Health Effects of Coffee: Mechanism Unraveled? *Nutrients* 2020; **12**(6). <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2021/FO/D0FO01768J> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
134. Gao X, Xie Q, Kong P, et al. Polyphenol- and Caffeine-Rich Postfermented Pu-erh Tea Improves Diet-Induced Metabolic Syndrome by Remodeling Intestinal Homeostasis in Mice. *Infect Immun* 2018; **86**(1). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5736808/pdf/e00601-17.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
135. Kleber Silveira A, Moresco KS, Mautone Gomes H, et al. Guarana (Paullinia cupana Mart.) alters gut microbiota and modulates redox status, partially via caffeine in Wistar rats. *Phytother Res* 2018; **32**(12): 2466-74. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/ptr.6185> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
136. Gonzalez S, Salazar N, Ruiz-Saavedra S, Gomez-Martin M, de Los Reyes-Gavilan CG, Gueimonde M. Long-Term Coffee Consumption is Associated with Fecal Microbial Composition in Humans. *Nutrients* 2020; **12**(5). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7282261/pdf/nutrients-12-01287.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
137. Scheperjans F, Pekkonen E, Kaakkola S, Auvinen P. Linking Smoking, Coffee, Urate, and Parkinson's Disease - A Role for Gut Microbiota? *J Parkinsons Dis* 2015; **5**(2): 255-62. <https://content.iospress.com/download/journal-of-parkinsons-disease/jpd150557?id=journal-of-parkinsons-disease%2Fjpd150557> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)

138. Ratajczak W, Ryl A, Mizerski A, Walczakiewicz K, Sipak O, Laszczynska M. Immunomodulatory potential of gut microbiome-derived short-chain fatty acids (SCFAs). *Acta Biochim Pol* 2019; **66**(1): 1-12. <https://ojs.ptbioch.edu.pl/index.php/abp/article/view/2648/1733> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
139. Nii T, Maeda Y, Motooka D, et al. Genomic repertoires linked with pathogenic potency of arthritogenic *Prevotella copri* isolated from the gut of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2023; **82**(5): 621-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10176341/pdf/ard-2022-222881.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
140. Maeda Y, Takeda K. Role of Gut Microbiota in Rheumatoid Arthritis. *J Clin Med* 2017; **6**(6). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5483870/pdf/jcm-06-00060.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
141. Elsouiri K, Arboleda V, Heiser S, Kesselman MM, Demory Beckler M. Microbiome in Rheumatoid Arthritis and Celiac Disease: A Friend or Foe. *Cureus* 2021; **13**(6): e15543. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8269990/pdf/cureus-0013-00000015543.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
142. Yu D, Du J, Pu X, et al. The Gut Microbiome and Metabolites Are Altered and Interrelated in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Front Cell Infect Microbiol* 2021; **11**: 763507. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8821809/pdf/fcimb-11-763507.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
143. De Luca F, Shoenfeld Y. The microbiome in autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol* 2019; **195**(1): 74-85. <https://acrjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/art.41697> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
144. Chen B, Sun L, Zhang X. Integration of microbiome and epigenome to decipher the pathogenesis of autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2017; **83**: 31-42. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0896841117301786?via%3Dihub> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
145. Li Y, Zhang SX, Yin XF, et al. The Gut Microbiota and Its Relevance to Peripheral Lymphocyte Subpopulations and Cytokines in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J Immunol Res* 2021; **2021**: 6665563. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7810541/pdf/JIR2021-6665563.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
146. Pianta A, Arvikar S, Strle K, et al. Evidence of the Immune Relevance of *Prevotella copri*, a Gut Microbe, in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2017; **69**(5): 964-75. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5406252/pdf/nihms830591.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
147. Jiang L, Shang M, Yu S, et al. A high-fiber diet synergizes with *Prevotella copri* and exacerbates rheumatoid arthritis. *Cell Mol Immunol* 2022; **19**(12): 1414-24. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9709035/pdf/41423\\_2022\\_Article\\_934.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9709035/pdf/41423_2022_Article_934.pdf) (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
148. Tett A, Huang KD, Asnicar F, et al. The *Prevotella copri* Complex Comprises Four Distinct Clades Underrepresented in Westernized Populations. *Cell Host Microbe* 2019; **26**(5): 666-79 e7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6854460/?report=reader> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
149. Schnupf P, Gaboriau-Routhiau V, Gros M, et al. Growth and host interaction of mouse segmented filamentous bacteria in vitro. *Nature* 2015; **520**(7545): 99-103. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5102327/pdf/emss-70049.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
150. Gaboriau-Routhiau V, Rakotobe S, Lecuyer E, et al. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity* 2009; **31**(4): 677-89. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S107476130900404X?via%3Dihub> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)
151. Teng F, Klinger CN, Felix KM, et al. Gut Microbiota Drive Autoimmune Arthritis by Promoting Differentiation and Migration of Peyer's Patch T Follicular Helper Cells. *Immunity* 2016; **44**(4): 875-88.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5296410/pdf/nihms776862.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)

152. Neshar G, Mates M, Zevin S. Effect of caffeine consumption on efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; **48**(2): 571-2. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/art.10766> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)

153. Montesinos MC, Yap JS, Desai A, Posadas I, McCrary CT, Cronstein BN. Reversal of the antiinflammatory effects of methotrexate by the nonselective adenosine receptor antagonists theophylline and caffeine: evidence that the antiinflammatory effects of methotrexate are mediated via multiple adenosine receptors in rat adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; **43**(3): 656-63. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/1529-0131%28200003%2943%3A3%3C656%3A%3AAID-ANR23%3E3.0.CO%3B2-H> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)

154. Cronstein BN, Eberle MA, Gruber HE, Levin RI. Methotrexate inhibits neutrophil function by stimulating adenosine release from connective tissue cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**(6): 2441-5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC51248/pdf/pnas01056-0415.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)

155. Benito-Garcia E, Heller JE, Chibnik LB, et al. Dietary caffeine intake does not affect methotrexate efficacy in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2006; **33**(7): 1275-81. <https://www.jrheum.org/content/jrheum/33/7/1275.full.pdf> (zuletzt abgerufen am 04.07.2024)

## 6. Anhang

### 6.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über die Interaktionen der zellulären Hauptakteure und ihrer produzierten Zytokine in den Gelenken von RA-Patienten. 17

Abbildung 2: Schema über Hauptmetaboliten des Koffeinstoffwechsels im Menschen modifiziert nach Nehlig et al. Abk. NAT2, N-Acetyltransferase-2; XO, Xanthinoxidase 28

### 6.2. Tabellenverzeichnis

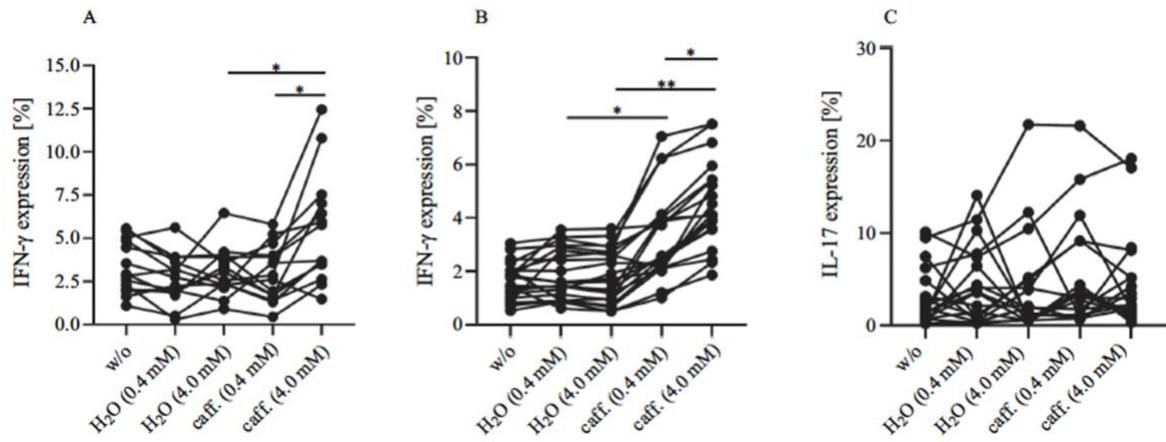
Tabelle 1: ACR-/EULAR-Klassifikationskriterien 2010<sup>26</sup> zur Diagnosestellung einer RA. Ab  $\geq 6$  Punkten und einer gesicherten Synovialitis ohne andere erklärliche Ursache ist die Diagnosestellung möglich. 13

Tabelle 2: Übersicht über die an der Pathogenese von RA beteiligten Subtypen von CD4+ T Zellen und ihre Zytokinprofile modifiziert nach Luo et al.<sup>35</sup> 24

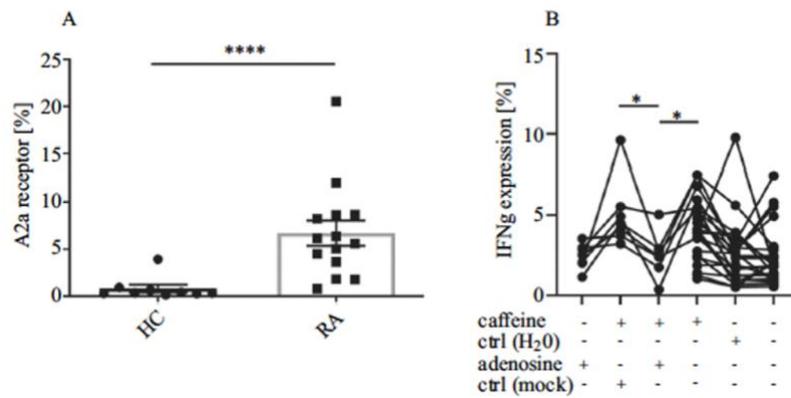
Tabelle 3: Übersicht von Studiendesigns über die Korrelation von RA-Erkrankungsrisiko und Kaffee-, Koffein- und Teekonsum. Konsum jeweils erhoben in Tassen pro Tag. Abkürzungen: MCHES (Mobile Clinic Health Examination Survey Study), IWHS (Iowa Women's Health Study), NHS (Nurses Health Study), DNPR (Danish National Patient Registry), WHI-OS (Women's Health Initiative Observational Study), KNHANES (Korea National Health and Nutrition Examination Survey), EIRA (Epidemiological Investigation of RA), NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey), E3N (Étude Épidémiologique auprès des femmes de la Mutuelle Générale de l'Éducation Nationale) 33

### 6.3. Graphen und Supplemental Material der Originalpublikation

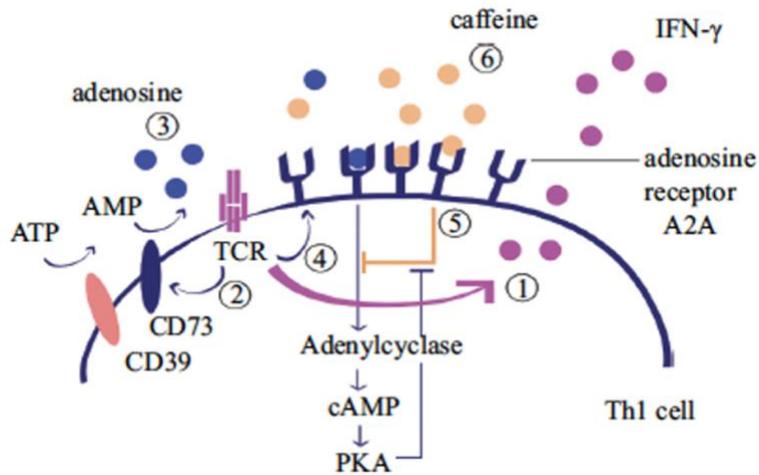
#### 6.3.1. Figure 1



#### 6.3.2. Figure 2



#### 6.3.3. Figure 3

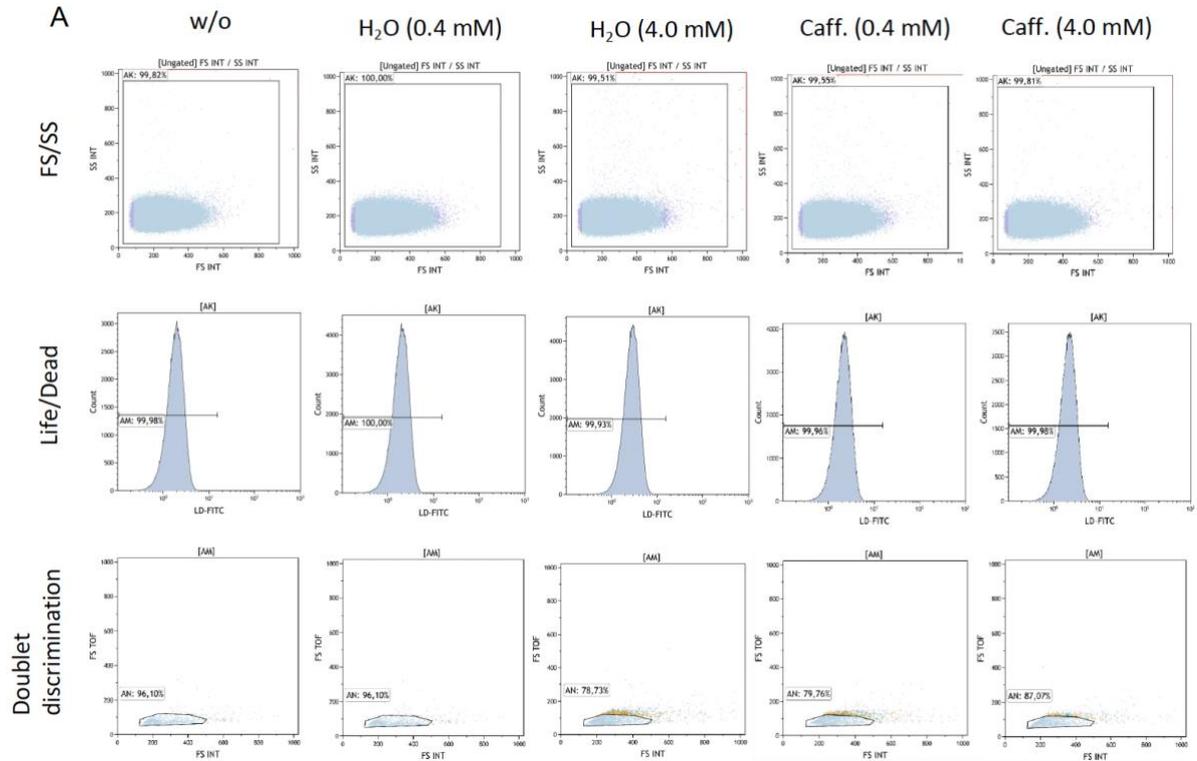


### 6.3.4. Supplementary table S1

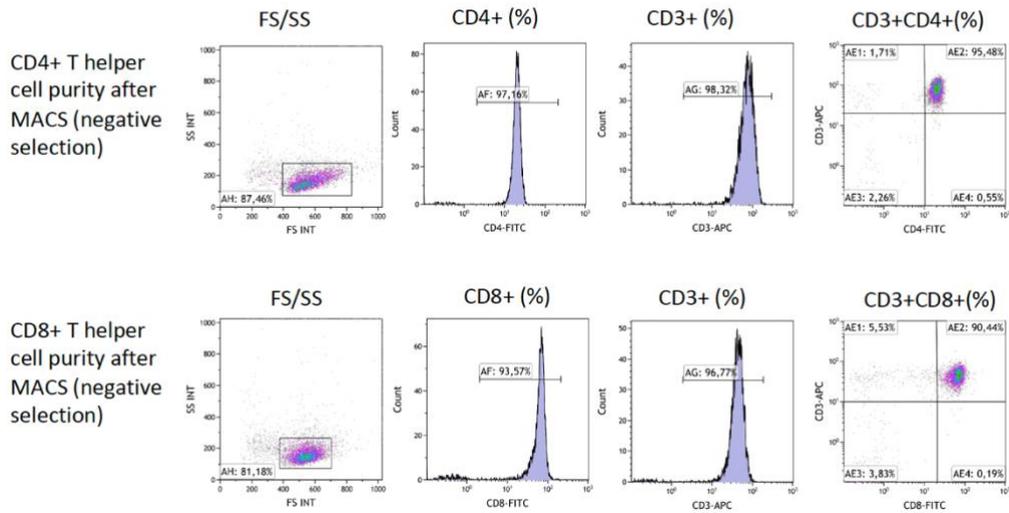
Characteristics		Healthy controls (n=14)	RA patients (n=40)	$p$ value
Gender	Female	8	24	> 0.05
	Male	6	16	
Age [years]		47.3 ± 5.9	49.8 ± 6.2	> 0.05
Disease duration [years]		n.a.	6.5 ± 4.1	
Rheumatoid factor [kU/l] (<5.0 kU/l)*		n.d.	39.1 ± 12.5 **	
ACPA [RE/ml] (<14.0 RE/ml)*		n.d.	51.7 ± 20.3 ***	
CRP [mg/l] (<5.0 mg/l)*		n.d.	4.9 ± 4.4	
ESR [mm/h] (<21 mm/h)*		n.d.	23 ± 5.8	
DAS-28		n.a.	3.7 ± 1.5	

Mean values ± SEM are shown; *n.a.* not applicable; *n.d.* not determined; *ACPA* anti-cyclic citrullinated peptide antibodies; *CRP* c-reactive protein; *ESR* erythrocyte sedimentation rate; *DAS28* disease activity score of 28 joints; \* cut -off value; \*\* rheumatoid factor positive: n=34; \*\*\* ACPA positive: n=32

### 6.3.5. Supplementary figure S1

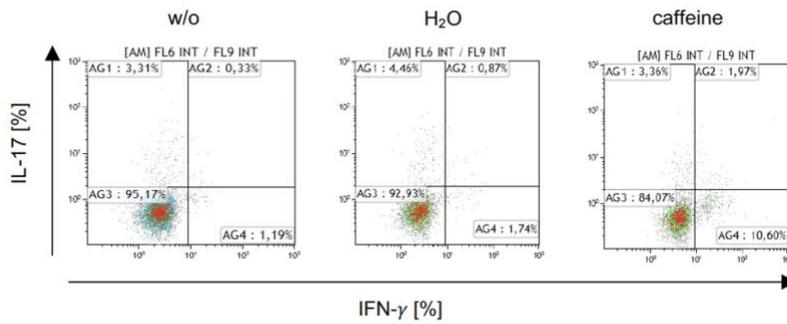


B

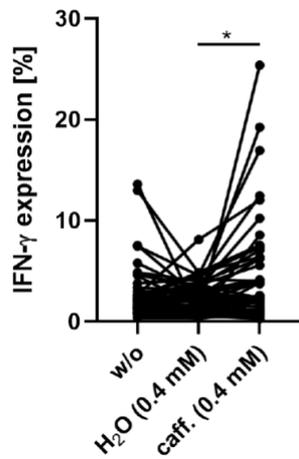


### 6.3.6. Supplementary figure S2

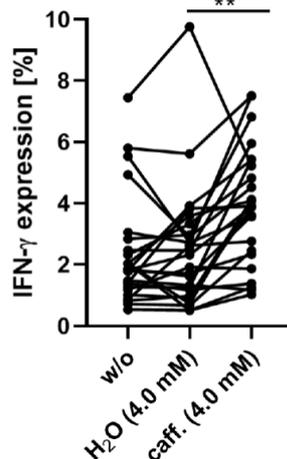
A



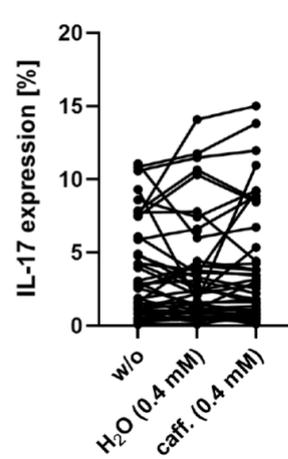
B

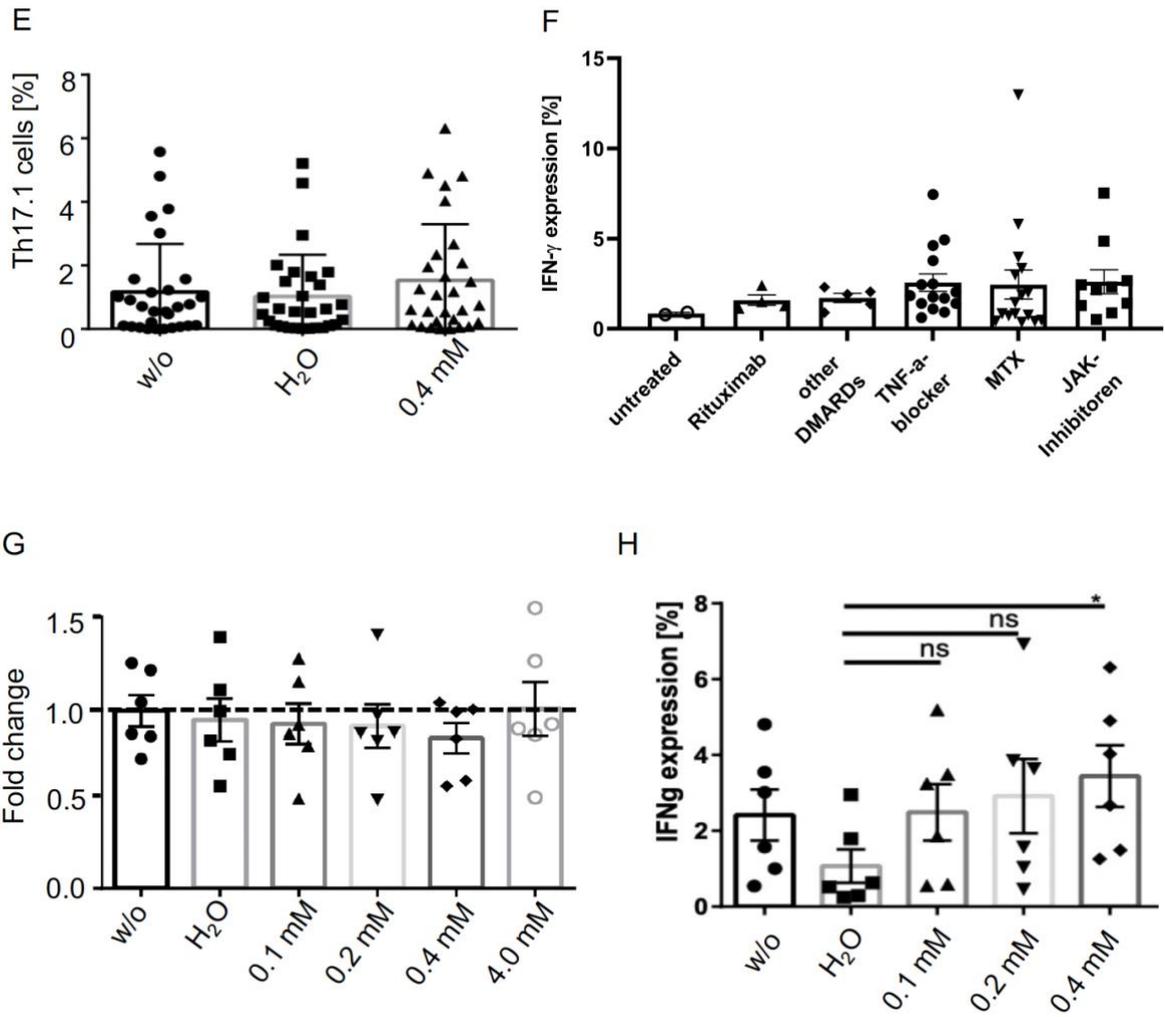


C

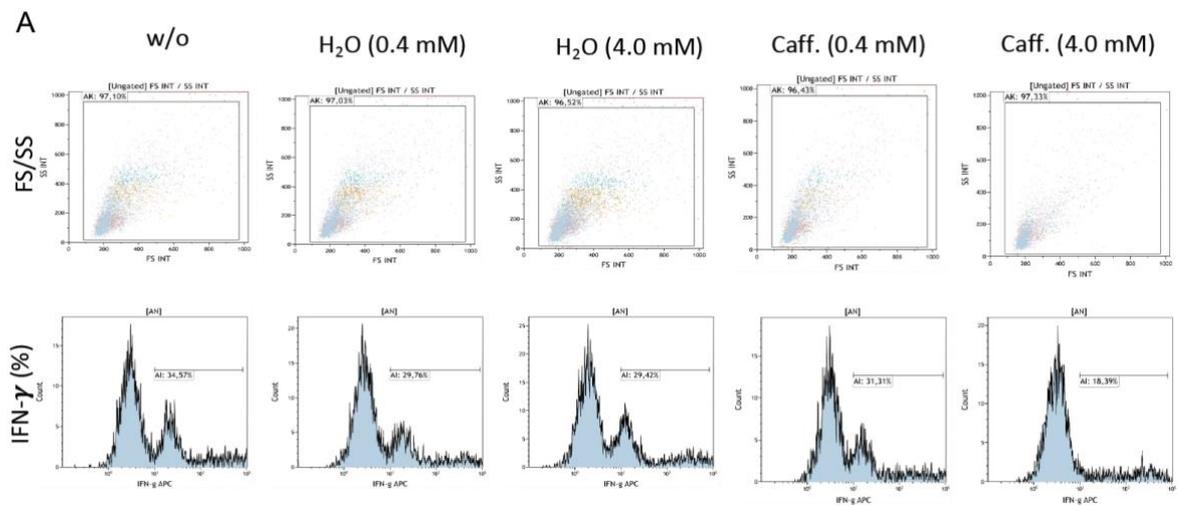


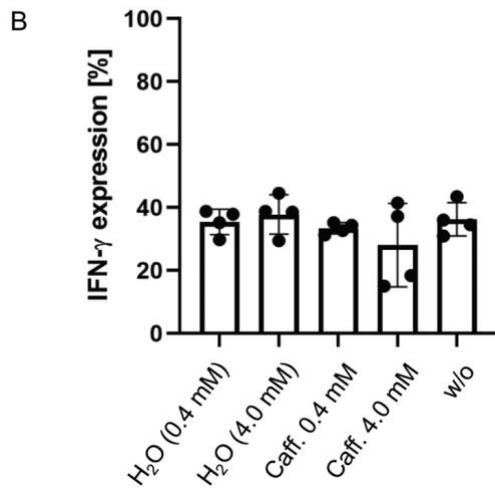
D





### 6.3.7. Supplementary figure S3





**6.3.8. Supplementary figure S4**

