

Aus der Poliklinik, dem Funktionsbereich und
dem Hiller Forschungszentrum für Rheumatologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Matthias Schneider

**Zusammenhang zwischen Coffein und
B-Zell-Aktivität bei Patienten mit
Systemischem Lupus Erythematoses**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Madita Viola Wippich
2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Georg Pongratz

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Germing

Es ist, wie es ist, und es kommt, wie es kommt.

-Jonas Jonasson

(aus: „Der Hundertjährige, der aus dem Fenster stieg und verschwand“)

Abkürzungsverzeichnis

ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
ADOR	Adenosin-Rezeptoren
ANA	Antinukleäre Antikörper
APC	Allophyocyanin
AZA	Azathioprin
BAFF/BLyS	<i>B-cell-activating-factor/B-Lymphocyte Stimulator</i>
BCR	<i>B-Cell-Rezeptor</i>
B_{reg}	regulatorische B-Zelle
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD40	<i>anti-Cluster of Differentiation 40</i>
Coffein_{low}	Coffein in einer Konzentration von 0,1 µg/ml
Coffein_{high}	Coffein in einer Konzentration von 50 µg/ml
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotid 2,5 µg/ml
CSA	Cyclosporin A
CSR	<i>class switch recombination</i>
dsDNA AK	anti-Doppelstrang-DNA-Antikörper
dsDNA screen AK	dsDNA Antikörper des Typs IgG, IgM und IgA
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FBS	Fetales Bovines Serum
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
FSC	<i>Forward Scatter</i>
GC	<i>Germinal Center/Keimzentrum</i>
GWAS	<i>genome-wide association studies</i>
HCQ	Hydroxychloroquin
HRP	<i>Horse-Radish-Peroxidase</i>
IFN	Interferon
IL-10	Interleukin-10
IL-21	Interleukin-21
MANOVA	<i>Multivariate Analysis of Variance</i>
MMF	Mycophenolat Mofetil
MTX	Methotrexat
NECA_{low}	NECA in einer Konzentration von 10 ⁻¹⁰ mol/l
NECA_{medium}	NECA in einer Konzentration von 10 ⁻⁸ mol/l
NECA_{high}	NECA in einer Konzentration von 10 ⁻⁷ mol/l
NFκB	<i>nuclear factor kappa B</i>
NSAR	Nicht-steroidale Anti-Rheumatika
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline/Phosphatgepufferte Salzlösung</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP-Vio700	Perdinin Chlorophyll-Protein-Vio700
PI	Propidiumjodid
PRE	Prednisolon
RPMI Medium	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SAC	<i>Staphylococcus Aureus Cowan I Protein A</i>
SD	<i>Standard Deviation/Standardabweichung</i>
SHM	<i>somatic hypermutation</i>
SLAQ	<i>Systemic Lupus Activity Questionnaire</i>
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes

SLEDAI	<i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index</i>
SMD	<i>Standardized Mean Difference</i>
SSC	<i>Sideward Scatter</i>
T_{eff}	T-Effektorzelle
TLR	<i>Toll-like-receptor</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
T_{reg}	regulatorische T-Zelle
UKD	Universitätsklinikum Düsseldorf

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 DER SYSTEMISCHE LUPUS ERYTHEMATODES.....	1
1.2 PATHOGENESE DES SLE.....	2
1.2.1 TLR-Signalweg.....	2
1.2.2 IL-10.....	3
1.3 COFFEIN UND DER ADENOSIN-SIGNALWEG.....	3
1.4 B-ZELL-SUBPOPULATIONEN.....	5
1.4.1 B-Zell-Reifungsstadien.....	5
1.4.2 Regulatorische B-Zellen.....	6
1.5 ALLGEMEINES ZU OBERFLÄCHENMARKERN.....	7
1.6 ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	8
2 MATERIAL	9
2.1 BLUTENTNAHME.....	9
2.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	9
2.3 MEDIUM UND ZELLKULTUR-ZUSÄTZE.....	9
2.4 DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	10
2.5 TECHNISCHE GERÄTE UND SOFTWARE.....	11
2.6 ELISA.....	13
2.7 CHEMIKALIEN.....	13
2.8 RNA.....	13
3 METHODEN	14
3.1 ETHISCHE ASPEKTE.....	14
3.2 BLUTGEWINNUNG.....	14
3.3 B-ZELL-SEPARATION.....	14
3.3.1 Methode und Prinzip.....	14
3.3.2 Durchführung.....	15
3.4 STIMULATION.....	16
3.5 DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	16
3.5.1 Methode und Prinzip.....	16
3.5.2 Gating Strategie.....	17
3.5.3 Durchführung.....	19
3.6 ELISA (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY).....	20
3.6.1 Prinzip.....	20
3.6.2 Anti-ds-DNA-ELISA: Durchführung.....	21
3.6.3 IgG/IgM-ELISA: Durchführung.....	22
3.6.4 IL-10-ELISA: Durchführung.....	22
3.7 STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	23
3.7.1 Analyse Durchflusszytometrie.....	23
3.7.2 Zellkultur-Daten (Ergebnisse der ELISA).....	23
3.8 ERKLÄRUNG DER AUTORIN.....	24
4 ERGEBNISSE	25
4.1 KLINISCHE INFORMATIONEN.....	25
4.1.1 Analyse der B-Zell-Subpopulationen.....	26

4.1.2	<i>Ergebnisse der Stimulation in der Zellkultur</i>	33
5	DISKUSSION	41
5.1	<i>VERSCHIEBUNG DER B-ZELL-KOMPARTIMENTE BEI SLE-PATIENTEN IN REMISSION</i>	41
5.1.1	<i>Erhöhter Anteil transitionaler und aktivierter Zellen beim SLE</i>	41
5.1.2	<i>Leichte Unterschiede in der CD73 Expression bei SLE und HC</i>	41
5.2	<i>APOPTOSE IST BEI SLE TROTZ REMISSION ERHÖHT, COFFEIN HAT AMBIVALENTE WIRKUNGEN</i>	43
6	SCHLUSSFOLGERUNGEN	46
7	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	47

1 Einleitung

1.1 Der Systemische Lupus Erythematodes

Der Systemische Lupus Erythematodes (SLE) ist eine Autoimmunerkrankung aus dem Bereich der Kollagenosen mit noch nicht vollständig verstandener Pathogenese. Die Erkrankung kennzeichnet sich klinisch durch einen schubartigen Verlauf mit verschiedenen Ausprägungen. Typisch ist das Auftreten von anti-Doppelstrang-DNA-Antikörpern (dsDNA AK), Antinukleären Antikörpern (ANA) und Zytokinen. Frauen sind häufiger betroffen als Männer.

Die Symptome dieses komplexen Krankheitsbildes können sich vielfältig äußern und reichen von kutanen Manifestationen über Gelenkbefall bis hin zu lebensbedrohlichen Organbeteiligungen an Niere oder zentralem Nervensystem (ZNS). Diese Organschäden können durch Komplementaktivierung und darauffolgende Immunkomplexbildung entstehen, die sich dann z.B. in der Niere ablagern. Therapeutisch ist ein wirksames immunsuppressives Vorgehen erforderlich, um Organschäden bis hin zum Tod zu vermeiden.

Zur Klassifikation des SLE gibt es die 1997 revidierten Kriterien des *American College of Rheumatology (ACR)*, anhand derer eine klinische Identifizierung von Patienten möglich ist (1). Für eine Klassifikation sind 4 der 11 Kriterien erforderlich. Zu diesen Kriterien gehören unter anderem das Auftreten des pathognomonischen Schmetterlingerythems, Fotosensitivität, hämatologische Veränderungen wie z.B. eine Lymphozytopenie oder organische Manifestationen wie eine Arthritis an 2 peripheren Gelenken, Serositis an Pleura oder Perikard, Nierenbeteiligung, die sich z.B. in Form einer Proteinurie äußern kann oder eine ZNS-Beteiligung, z.B. in Form von Krampfanfällen oder Psychosen.

Eine neue Klassifikation wurde 2019 von Aringer vorgestellt (2). Diese neue Klassifikation setzt als Einstiegs Kriterium einen positiven ANA-Serostatus in der Patientengeschichte voraus. Weiterhin gibt es mittels Punktesystem gewichtete Kriterien (von 2 bis 10 pro Kriterium), deren Schwellenwert zur Klassifizierung als SLE bei 10 Punkten liegt. Zum Beispiel wird eine Lupus-Nierenbeteiligung Grad III oder IV (10 Punkte) deutlich stärker gewichtet als beispielsweise der Nachweis von Anti-Phospholipid-Antikörpern (2 Punkte). Die neuen EULAR/ACR Kriterien sollen die Vorteile der Sensitivität und Spezifität bisheriger Klassifikationen verbinden.

Für weiterführende Diagnostik stehen serologische Parameter wie der dsDNA AK-Titer, ANA, erniedrigte Komplementfaktoren C3 und C4 sowie eine Haut- oder Nierenbiopsie bei entsprechendem Befall zur Verfügung. Ein Anstieg der dsDNA AK kann schon Monate im Voraus einen Krankheitsschub ankündigen (3,4). Es gibt verschiedene Subtypen von dsDNA Antikörpern. Hier untersucht wurden die Subtypen IgG, IgM und (in den Vorversuchen) IgA. Diese Subtypen sind sowohl bei SLE Patienten als auch bei Gesunden nachweisbar, interessant hierbei ist jedoch die unterschiedliche Ausprägung der Titerhöhe (5). Erhöhte Titer von dsDNA IgG AK wird eine pathognomonische Rolle beim SLE zugeschrieben, da sie mit erhöhter Krankheitsaktivität assoziiert sind (6,7). Die dsDNA IgM AK scheinen eine

protektive Rolle einzunehmen. Im Vergleich zu SLE Patienten haben gesunde Kontrollen erhöhte dsDNA IgM Titer (5), und erhöhte Titer von dsDNA IgM gehen mit einer niedrigeren Rate einer Nierenbeteiligung einher (7–9). Die Funktion der dsDNA IgA AK ist noch nicht gut untersucht, und bisherige Ergebnisse sind teils widersprüchlich. Eine Assoziation von erhöhten IgA Titern mit der Krankheitsaktivität ist beschrieben, während es widersprüchliche Ergebnisse zur Assoziation mit einer Nierenbeteiligung gibt (7,10).

Als Therapie stehen bei leichten Verläufen NSAR und Antimalariamittel wie Hydroxychloroquin zur Verfügung. Bei schweren Verläufen mit Organbeteiligungen werden zusätzlich zur Glukokortikoidtherapie Immunsuppressiva (z.B. Cyclophosphamid, Azathioprin oder Mycophenolat mofetil) angewendet. Weiterhin steht seit einigen Jahren für Patienten, die schlecht auf andere Therapien ansprechen, eine B-Zell Therapieoption mittels monoklonaler Antikörper (*Biologicals*, z.B. Belimumab) zur Verfügung (11).

Belimumab ist ein humaner monoklonaler Antikörper, der lösliches BAFF (Blys) bindet und blockiert (12). BAFF (*B cell activating factor*) ist ein B-Zell-Überlebensfaktor aus der Tumornekrosefaktor (TNF)-Superfamilie. BAFF spielt eine wichtige Rolle bei der Homöostase und Entwicklung von B-Zellen. Belimumab hemmt u.a. die Weiterentwicklung der frühen transitionalen B-Zellen sowie von Plasmazellen in langlebige Plasmazellen und kann BAFF-abhängige Teile der Keimzentrumsreaktion beeinflussen, sodass sich keine hochaffinen Gedächtniszellen bilden können (13). Der klinische Einsatz von Belimumab ist nach bisherigen Studien vielversprechend und umfasst eine Reduktion der Krankheitsschübe, des Krankheitsschweregrades und der Proteinurie (14,15). Belimumab ist heute ein gutes Therapeutikum für Patienten, die bislang nur schlecht auf die Standardtherapie ansprachen (16).

1.2 Pathogenese des SLE

1.2.1 TLR-Signalweg

Die genaue Ätiologie des SLE ist bis heute nicht geklärt. Es werden genetische Faktoren, Umweltfaktoren sowie deren Zusammenspiel als Ursachen diskutiert, die eine Dysregulation der T- sowie B-Zellen und deren Immunantwort bedingen. Fehlregulierte Apoptose scheint als Quelle für Autoantigene zu dienen (17). Bisher vorhandene Therapieoptionen greifen an verschiedenen Stellen im Immunsystem an. Die Antimalariamittel Hydroxychloroquin und Chloroquin wirken über eine Inhibition der sogenannten *Toll-like-Receptors* (TLR). Veröffentlichungen der letzten Jahre stützen die These, dass die Autoaktivierung der B-Zellen in SLE insbesondere vom TLR-9 Aktivierungsweg abhängt als von T-Zellen (18–20). So können Autoantigene wie z.B. Nukleinsäuren, die bei physiologischen Apoptosevorgängen frei werden und nicht von Fresszellen beseitigt werden, als Liganden der TLRs dienen (21). Da diese TLRs intrazellulär exprimiert werden, müssten die Antigene über Transportmechanismen in das Innere der Zelle gelangen. Als Transportmediatoren könnten hierbei Oberflächenrezeptoren der jeweiligen Zelllinie dienen, wie z.B. der oberflächliche IgM-Rezeptor (*B cell receptor*, BCR) bei den B-Zellen (22). Die Aktivierung von TLRs induziert über vermehrte Genexpression von intranukleärem *nuclear factor kappa B* (NFκB) eine Produktion inflammatorischer Mediatoren wie Tumornekrosefaktor α (TNF-α) oder Interleukin-6 (IL-6) sowie die Aktivierung verschiedener Immunzellen (23).

TLR-9 ist ein Rezeptor für unmethylierte, mikrobielle Cytosin-Guanin-Dinukleotide (CpG-DNA) und existiert nur auf plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) und B-Zellen (21). Jüngste Studien zeigen eine erhöhte Expression von TLR-9 auf Lupus-B-Zellen sowie eine positive Korrelation von TLR9-Expression mit dsDNA AK Serumentitern (7–11,17,18). Passend hierzu findet sich eine verminderte dsDNA AK Produktion im TLR9-*Knockout* Mausmodell.

1.2.2 IL-10

Interleukin-10 (IL-10) ist ein immunregulatorisches Zytokin, welches pleiotrope, sowohl anti- als auch proinflammatorische Effekte, abhängig vom Ort und Zeitpunkt seiner Expression als auch seiner Dosis haben kann.

Die antiinflammatorische Wirkung von IL-10 kann beispielsweise anhand der T-Zell-Suppression über eine Inhibition antigenpräsentierender Zellen (APCs) gezeigt werden. Auch eine Inhibition proinflammatorischer Zytokine von dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen kann durch IL-10 vermittelt werden (24). Aber auch proinflammatorische Eigenschaften wie insbesondere Effekte von IL-10 auf die Proliferation von B-Zellen sowie auf den Immunglobulin-Klassenwechsel von Gedächtniszellen sind beschrieben (24) und scheinen besonders beim SLE eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Krankheit zu spielen (25). Es gibt Hinweise darauf, dass beim SLE erhöhte IL-10 Titer mit erhöhter Krankheitsaktivität und Organbeteiligung zu korrelieren scheinen (24,26–28). Genauso gibt es allerdings auch Hinweise darauf, dass IL-10 eine immunsuppressive Rolle auch beim SLE spielen könnte (29–31). Der SLE ist durch eine erhöhte Autoantikörperproduktion und B-Zell-Hyperreaktivität gekennzeichnet. Man vermutet, dass IL-10 durch seine Wirkungen (z.B. auf die B-Zell-Differenzierung) die Krankheit eher unterhält als hemmt (27,32,33).

1.3 Coffein und der Adenosin-Signalweg

Die Rolle des Adenosins als Signalmolekül wurde zuerst 1929 am Ochsenherzen (34) beschrieben. Seither wurden auch andere Funktionsbereiche des Adenosins gefunden und beschrieben, die nicht nur das Herz, sondern auch das ZNS und das Immunsystem umfassen. Insbesondere die regulatorische Wirkung des Adenosins auf Inflammation ist heute unumstritten (35,36). Man weiss, dass Adenosinrezeptoren (ADOR) auf molekularer Ebene als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren über eine intrazelluläre cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat)-Erhöhung (A2a, A2b) oder Erniedrigung (A1, A3) wirken (36). Rezeptoren für Adenosin sind an vielen Immunzellen vorhanden; ihre Wirkung auf das Immunsystem hängt vom Rezeptor-Subtyp ab. Die immunmodulatorische Wirkung der einzelnen Rezeptoren steht zunehmend im Interesse, da sie einen Ansatz für die klinische Anwendung von ADOR-basierten Therapien bietet (37). An Makrophagen z.B. bewirkt Adenosin durch Erhöhung des cAMP eine Reduktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-12 (38). Es gibt Hinweise darauf, dass die antiinflammatorische Wirkung von Methotrexat (MTX), ein bei Rheumatoider Arthritis (RA) und SLE verbreitetes Therapeutikum, teilweise über eine Erhöhung der Adenosinkonzentration und damit auf eine Aktivierung von ADOR zurück zu führen ist. Eine Antagonisierung mit Coffein bewirkt bei RA im Rattenmodell (39) und auch beim Menschen (40) eine Reduktion der Effektivität der MTX-Therapie. Diese Studien geben Hinweise auf die klinische Relevanz des Adenosin-Signalwegs, es fehlen aber insbesondere auf den SLE bezogen weitere Erkenntnisse.

Auch B-Zellen besitzen ADOR auf ihrer Oberfläche. Bisher sind eher T- als B-Zellen auf ihre ADOR-Expression und -funktion hin charakterisiert worden. Saze et al. beschreiben eine Expression von A1, A2a und A3- Rezeptoren auf B-Zellen, nicht jedoch von A2b (41). Weiterhin könnten A1 und A3- Rezeptoren einem autokrinen Signalweg dienen, wobei die Aktivierung von A1-Rezeptoren zu einer B-Zell-Proliferation und von A3-Rezeptoren zu einer B-Zell-Suppression führen könnten (41,42). Adenosin kann über die Expression der Enzyme CD39 und CD73 aus ATP, welches vermehrt bei Inflammation anfällt, dephosphoryliert werden. Die Expression dieser Enzyme ist hierbei nicht, wie bisher gedacht, nur auf einem kleinen Teil der B-Zellen zu finden, sondern bei bis zu 90 % (41). Ein kleiner Teil dieser Zellen exprimiert CD39_{high}. Diesem Subset werden regulatorische Funktionen zugeschrieben, die über die Sezernierung antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 und IL-35 Einfluss auf andere Immunzellen (T-Zellen, Makrophagen, etc.) nehmen können (42,43).

Durch Stimulation mit einem A2a-Agonisten und Antagonisierung der übrigen ADOR lässt sich bei *in vitro* Experimenten eine Abnahme der B-zellulären IgM- Produktion feststellen (44). Bortoluzzi et al. stellten bei SLE Patienten eine erhöhte Expression von A2a-ADOR fest und schrieben einer Aktivierung dieses Rezeptors antiinflammatorische Wirkungen zu (45). Die Rolle des Adenosin-Signalwegs in der Pathogenese des SLE ist jedoch nicht abschließend geklärt.

Coffein gehört zur Klasse der Methylxanthine und ist das meistkonsumierte Psychostimulanz der Welt. Es befindet sich in Kaffee, grünem und schwarzem Tee, einigen Schokoladensorten, aber auch als Zusatz in Medikamenten (46). Auf molekularer Ebene fungiert Coffein hauptsächlich als unspezifischer Antagonist an den Adenosinrezeptoren (ADOR) A1, A2a, A2b und A3. Seine Wirkung auf das Immunsystem wird im Allgemeinen als eher antiinflammatorisch beschrieben(47)(45)(44)(44). So kann Coffein beispielsweise die Antikörperproduktion sowie die Proliferation von T-Lymphozyten hemmen (47). Es gibt jedoch kaum Studien, die sich mit der Wirkung des Coffeins auf den SLE beschäftigen.

1.4 B-Zell-Subpopulationen

1.4.1 B-Zell-Reifungsstadien

Die B-Zell-Lymphopoese geht von der hämatopoetischen Stammzelle aus, wobei B1- von B2-Zellen unterschieden werden (Abbildung 1-1 unten links). In der fetalen Leber werden aus Vorläuferzellen die B1-Zellen gebildet, die sich im adulten Organismus selbst erneuern können und über T-Zell-unabhängige (TI) Wege IgM Antikörper produzieren können. Diese B1-Zellen können CD5 exprimieren und stellen den wachsenden Organismus z.B. mit gegen Blutgruppen gerichteten Autoantikörpern aus (48). B1-Zellen, die sich in Peritoneum und Knochenmark ansiedeln, werden als eine der Hauptquellen für natürliche, antigenunabhängig generierte IgM-Antikörper angesehen (49). Die B2-Zellen hingegen entwickeln sich im Knochenmark zunächst zu unreifen, transitionalen (*transitionals*) B-Zellen. Transitionale Zellen sind bezogen auf ihre Oberflächenmarkerexpression und Funktion in der Maus besser beschrieben als beim Menschen (50). Abhängig von verschiedenen Signalen (51) wandern diese Zellen entweder in die Marginalzone der Milz oder in Lymphfollikel. Dort bezeichnet man sie dann entweder als Marginalzonen B-Zellen (MZB) oder als Follikuläre B-Zellen (FoC, Abbildung 1-1).

Nachdem sie sich in peripheren lymphatischen Organen angesiedelt haben, entwickeln sich die B-Zellen zu reifen naiven Zellen (*mature naive*). Sobald die reifen B-Zellen Antigenkontakt über ihren BCR haben und entsprechende Kosignale vorhanden sind, differenzieren sich MZ B-Zellen T-Zell unabhängig an extrafollikulären Stellen zu IgM produzierenden Zellen, oder follikuläre B-Zellen werden in Keimzentren T-Zell abhängig aktiviert. Im Keimzentrum finden außer der Interaktion mit T-Helfer Zellen verschiedene Reaktionen statt: die klonale Expansion der B-Zellen; somatische Hypermutation (*somatic hypermutation SHM*) der variablen Regionen von leichten und schweren Ketten der Immunglobuline im Rahmen der Affinitätsreifung (*affinity maturation*) sowie der Immunglobulinklassenwechsel (*class switch recombination CSR*) in Abhängigkeit der vorhandenen Zytokine (52,53). In der dunklen Zone des Keimzentrums (GC) proliferieren die B-Zellen und werden zu Zentroblasten. Dort findet auch die Affinitätsreifung statt. In der hellen Zone werden die GC B-Zellen Zentrozyten genannt, aus denen sich wiederum entweder Gedächtniszellen oder über Plasmablasten die Plasmazellen entwickeln. Plasmazellen können Antikörper produzieren: entweder als kurzlebige Plasmazellen (*short-lived*) oder als langlebige Plasmazellen (*long-lived*), die sich in spezialisierten Nischen im Knochenmark niederlassen und einen Antikörperspiegel über einen (lebens-) langen Zeitraum aufrechterhalten können (54). Die Gedächtniszellen hingegen patrouillieren auf der Suche nach ihrem Antigen das Blutkreislaufsystem (55) (Abbildung 1-1).

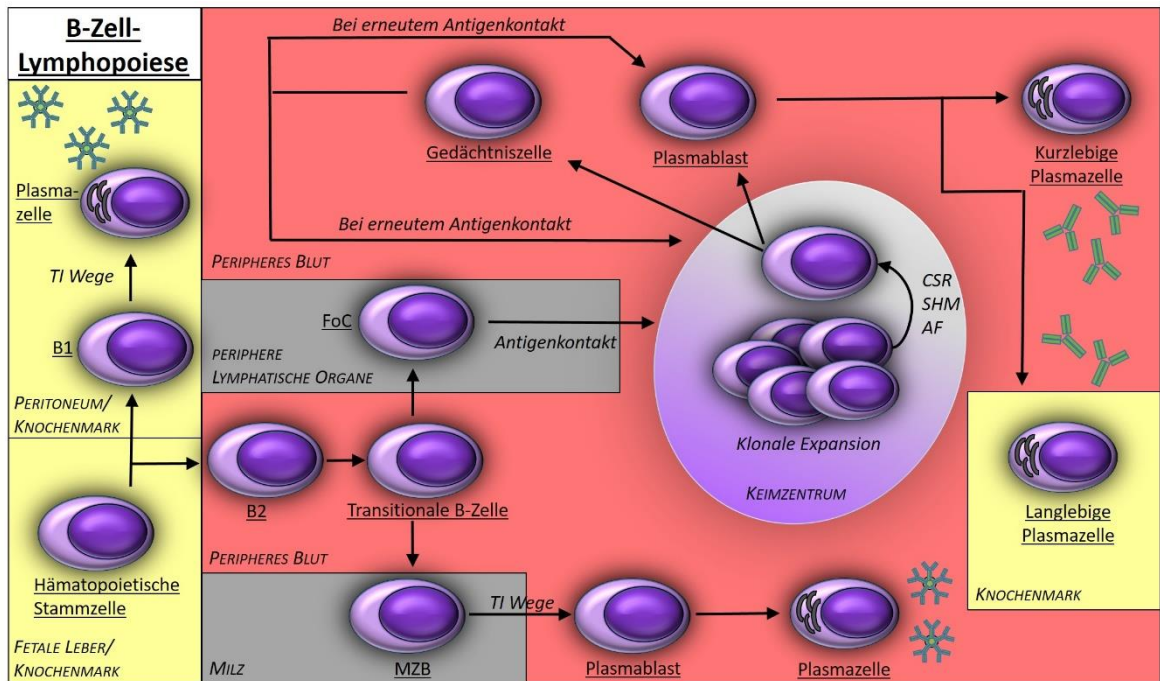


Abbildung 1-1: Schematische B-Zell-Lymphopoese. Ausgehend von der hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark (unten links) bilden sich B1- und B2-Zellen. B1-Zellen können über T-Zell-unabhängige Wege „natürliche“ IgM-Antikörper produzieren, während B2-Zellen als Transitionale Zellen ins periphere Blut abwandern. Von dort siedeln sie sich entweder in peripheren lymphatischen Organen an, wo sie als Follikuläre Zellen (FoC) oder Marginalzonen-B-Zellen (MZB) bezeichnet werden. MZB sind über T-Zell-unabhängige Wege relativ schnell zur Produktion von unspezifischem IgM in der Lage, und ermöglichen so dem Organismus eine schnelle Immunantwort. Follikuläre Zellen unterlaufen nach Antigenkontakt eine klonale Expansion: entweder extrafollikulär oder in den Keimzentren der Lymphknoten. Extrafollikulär entwickeln sich aus ihnen kurzlebige Plasmazellen, die unspezifisches IgM produzieren. In den Keimzentren unterlaufen die Zellen nach ihrer klonalen Expansion einem Immunglobulinklassenwechsel, einer somatischen Hypermutation mit Affinitätsreifung des B-Zell-Rezeptors. Das Ergebnis sind Plasmablasten und Gedächtniszellen, die beide für ihr Antigen hochaffin sind. Plasmablasten können zu kurzlebigen oder langlebigen Plasmazellen ausdifferenzieren, die Immunglobuline aller Klassen produzieren können. Gedächtniszellen patrouillieren das periphere Blut auf ihr Antigen, um bei erneutem Antigenkontakt erneut die Keimzentrumsreaktion zu durchlaufen, oder direkt für Antikörper durch Plasmazellen zu sorgen. TI: T-Zell-unabhängig, TD: T-Zell-abhängig, FoC: Follikuläre B-Zelle, MZB: Marginalzonen-B-Zelle, CSR: Immunglobulinklassenwechsel, SHM: Somatische Hypermutation, AF: Affinitätsreifung des B-Zell-Rezeptors.

Dieser Prozess der Reifung antikörperproduzierender Plasmazellen dauert einige Tage. Parallel reifen deshalb für eine schnelle Reaktion des Körpers auf einen Antigenstimulus einige MZB über T-Zell-unabhängige (TI) Wege schnell zu IgM-antikörperproduzierenden Plasmablasten heran, die allerdings nur eine niedrige Affinität haben (56) (Abbildung 1-1 unten).

1.4.2 Regulatorische B-Zellen

In jüngster Zeit schreibt man der B-Zelle neben ihrer Aufgabe als immunpromovierende Zelle (in Form von Antikörperproduktion) auch eine immuninhibierende Aufgabe zu.

Es gibt sowohl im Menschen als auch im Mausmodell verschieden definierte B-Zell-Subpopulationen, die als regulatorische B-Zellen (B_{regs}) bezeichnet werden. Ein Teil dieser B_{regs} zeichnet sich durch die Sekretion von IL-10 und TGF- β (*transforming growth factor* β) aus, mit deren Hilfe sie die Proliferation von CD4⁺ T-Effektorzellen (T_{eff}) hemmen und Einfluss auf regulatorische T-Zellen (T_{reg}) nehmen können (57).

Im Menschen sind bisher zwei verschiedene Subsets mit unterschiedlichen Oberflächenmarkern identifiziert worden. Unter anderem zeichnen sich B_{regs} durch eine

Expression von CD38^{high}, CD25^{high} und CD24 aus; ferner exprimieren sie CD39^{high} (42). In einem *Review* von Rosser et al. wird ausführlich über möglichen Ursprung und Funktion von B_{regs} berichtet: so scheint es möglich, dass B_{regs} sich abhängig von verschiedenen proinflammatorischen Signalen aus ihrer Umwelt aus prinzipiell allen B-Zell-Stufen bilden können, um eine überschießende Entzündungsreaktion zu hemmen (43). Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass B_{regs} bei Patienten mit SLE defekt sind, was möglicherweise Auswirkungen auf die Immunantwort bei SLE haben könnte (58). Welche Relevanz B_{regs} in der Aufrechterhaltung von Immunantwort und -toleranz im gesunden und kranken menschlichen Organismus haben, ist noch unklar.

1.5 Allgemeines zu Oberflächenmarkern

In dieser Studie wurden B-Zellen anhand der Oberflächenmarker CD19, CD21, CD27, CD38, CD138 und CD73 charakterisiert. Im Folgenden wird auf diese Marker kurz eingegangen.

CD19 ist ein Oberflächenantigen, das der Immunglobulinsuperfamilie angehört und spezifisch für B-Zellen ist. Es wird von frühen pro-B-Zell-Stadien bis zu aktivierten Plasmazellen exprimiert (59,60). CD19 ist an der Signaltransduktion für die humorale Immunantwort beteiligt, unter anderem indem es einen Komplex mit CD21, CD81 und CD225 bildet (61). Ferner ist es für die Aktivierung der B-Zellen über den TLR9-Signalweg nötig (60).

CD21 (auch *Complement Receptor* (CR) 2) ist ein Glykoprotein, das unter anderem auf reifen B-Zellen und follikulären dendritischen Zellen vorkommt. Es bindet das C3d-Fragment des Komplementfaktors C3 und kann als Rezeptor für das Epstein-Barr-Virus dienen (62). Ferner gibt es Hinweise, dass es IFN- α und DNA binden kann sowie zur Toleranz gegen Autoantigene beiträgt (63,64) und somit eine Rolle bei der Pathogenese des Lupus spielen könnte. In einem Mausmodell konnte der Genlocus für CR2 als mögliches Risikogen für die Entwicklung von SLE identifiziert werden (65) und eine verminderte Expression von CR1 und CR2 führte zum Ausbruch einer lupusartigen Erkrankung (66). Ferner weisen B-Lymphozyten von SLE-Patienten eine geringere Dichte von CD21 auf als solche Zellen von Kontrollen (67).

CD27 gehört zur TNF-Familie und beeinflusst Funktion, Überleben und Differenzierung von NK-, T- und B-Zellen (68). Es bindet sehr spezifisch an seinen Liganden CD70 und hat eine kostimulatorische Wirkung bei antiviralen und gegen Tumor oder allogenes Gewebe gerichteten Immunantworten (69). CD27 wird routinemäßig als Marker für B-Gedächtniszellen eingesetzt, diese können einen Ig-Klassenwechsel durchlaufen haben (CD27⁺ IgD⁻) oder nicht (CD27⁺ IgD⁺).

CD38 ist ein Membran-Glykoprotein, welches von verschiedensten hämatopoietischen Zellen und auch von verschiedenen Geweben exprimiert wird (70). Es reguliert durch seine hydrolytische Aktivität den intrazellulären Gehalt an Nicotinamidadenindinukleotid (NAD), einem ubiquitär vorkommenden Molekül, welchem bei vielen Signaltransduktionswegen sowie dem Energiestoffwechsel eine wichtige Rolle zukommt (71). Weiterhin ist CD38 an der Synthese zahlreicher intrazellulärer *second messenger* beteiligt. CD38 ist ein Marker für lymphozytäre Differenzierung und Reifung (72). Es kommt im peripheren Blut auf der

Oberfläche unreifer Transitionaler B-Zellen vor, die CD38 im Verlauf ihrer Reifung wieder verlieren, sodass sie es als Gedächtniszellen nicht mehr aufweisen und es erst als Plasmablasten erneut exprimieren. Das Ausmaß seiner Expression ändert sich dabei während des Reifungsprozesses.

CD138 (Syndekan-1) gehört zur Gruppe der Syndekane und wird von Epithelzellen und Plasmazellen exprimiert (73). Patienten mit SLE weisen einen höheren Anteil an CD38+ CD138+ Plasmazellen auf als gesunde Kontrollen, und Patienten mit aktiver Erkrankung haben einen höheren Anteil als Patienten in Remission (74).

CD73 wird auf B-Zellen mit CD39 koexprimiert. Die Kombination dieser beiden membranständigen Enzyme ermöglicht es den Zellen, extrazelluläres ATP (Adenosintriphosphat) in 5'-AMP (Adenosinmonophosphat) oder Adenosin umzuwandeln (41). So generiertes Adenosin treibt unter anderem die CSR bei der Generierung von Gedächtniszellen voran (75). Über die Expression von CD73 und darauffolgender Signalwege über ADOR können regulatorische B-Zellen die B-Zell-T-Zell-Interaktion beeinflussen (41). Während man von Patienten mit unbehandelter, chronischer HIV-Infektion weiß, dass sie einen geringeren Anteil CD73+ B-Zellen aufweisen als gesunde oder behandelte Kontrollen (76), ist über die Expression und Funktion beim SLE wenig bekannt.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es, *in vitro* den Einfluss von Coffein in physiologisch relevanten Dosen auf die Antikörperproduktion und IL-10 Produktion der B-Zellen von Lupuspatienten zu untersuchen und daraus Erkenntnisse über die Bedeutung des Kaffeekonsums bezüglich der Krankheitsaktivität bei SLE abzuleiten.

Wir postulieren als Arbeitshypothese einen positiven Effekt von Coffein auf die Krankheitsaktivität beim SLE, da es klinische Hinweise auf eine immunsupprimierende Wirkung gibt.

2 Material

2.1 Blutentnahme

Bezeichnung	Hersteller	Sitz des Herstellers
<i>BD Vacutainer K2E</i> (EDTA-Röhrchen)	Becton, Dickinson and Company	Franklin Lakes, NJ, USA
<i>BD Vacutainer Safety-Lok 21G-Butterfly</i>	Becton, Dickinson and Company	Franklin Lakes, NJ, USA
<i>Clearly Safe DuraPorter Sample Carrier</i>	Heathrow Scientific LLC	Vernon Hills, IL, USA

Tabelle 2-1: Materialien für Blutentnahme und –transport.

2.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller	Sitz des Herstellers
15ml <i>Tube</i> ohne Boden	Sigma Aldrich by Merck	Sigma Aldrich by Merck
<i>24 well plate Cell Culture</i>	Greiner Bio One GmbH	Kremsmünster, Österreich
<i>48well Cell Culture Dish Nunclon</i>	Capitol Scientific Inc.	Austin, TX, USA
50ml <i>Blue Max Tube</i> ohne Boden	Becton & Dickinson Labware	Franklin Lakes, NJ, USA
50ml <i>Cellstar Tubes</i> mit Boden	Sigma Aldrich by Merck	Sigma Aldrich by Merck
8er-Streifen	Nippon Genetics	Tokyo/Kyoto, Japan
<i>96 well plates flat bottom</i> Greiner	Sigma Aldrich by Merck	St. Louis, MO, USA
<i>96 well plates round bottom</i> Greiner Cellstar	Sigma Aldrich by Merck	St. Louis, MO, USA
Costar Stripette (25ml, 10ml, 5ml, 2ml)	Corning	Corning, NY, USA
<i>Deep Well Microplate 96 wells round bottom</i>	Brand	Wertheim, Deutschland
Leucosep- Röhrchen 50ml	Sigma Aldrich by Merck	St. Louis, MO, USA
LS Säulen	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Minisart Spitzenvorsatzfilter (0,2 µl)	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Omnifix 40 Solo (1 ml Insulinspritzen)	B Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Pasteurpipette (Natron-Kalk-Glas) 225 mm	Brand	Wertheim, Deutschland
<i>Preseparation Filter 30 µm</i>	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>Safe-lock-Tubes 1,5ml</i>	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
<i>Safe-lock-Tubes 2ml</i>	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

Tabelle 2-2: Verbrauchsmaterialien.

2.3 Medium und Zellkultur-Zusätze

Zur Herstellung des Mediums wurde dem RPMI 1640 Medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 1 % Penicillin/Streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 5 % hitzeinaktiviertes FBS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) und Insulin human (Sigma Aldrich by Merck, St. Louis, MO, USA) in einer Konzentration von 5 µg/ml beigelegt.

Bezeichnung	Hersteller	Sitz des Herstellers
Ampuwa (Steriles Wasser)	Fresenius Kabi Deutschland	Bad Homburg, Deutschland
BAFF	Sigma Aldrich by Merck	St. Louis, MO, USA
Caffeine	Sigma Aldrich by Merck	St. Louis, MO, USA
CD40 human	R&D Systems, Incorporation	Minneapolis, NE, USA
CpG (ODN2006) human	Invivogen	San Diego, CA, USA
Cytofix	Becton, Dickinson and Company	Franklin Lakes, NJ, USA
FBS, hitzeinaktiviert	Thermo Fisher Scientific™	Waltham, MA, USA
IL-2 human	Cell-Genix	Freiburg, Deutschland
IL-21 human	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
IL-4 human	Cell-Genix	Freiburg, Deutschland
Insulin <i>solution</i> human	Sigma Aldrich by Merck	St. Louis, MO, USA
Lymphoprep	Axis Shield PoC AS	Oslo, Norway
Macs Quant <i>Running Buffer</i> mit BSA	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Macs Quant <i>Running Buffer</i> ohne BSA	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Medium (RPMI 1640 mit Hepes 25mM)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
NECA	Abcam	Cambridge, UK
NECA-Derivat, A-633-AG	Sigma Aldrich by Merck	St. Louis, MO, USA
<i>Pan B-Cell Isolation Kit</i> human	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
PBS (10x), pH 7,4	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
<i>Propidiumiodide Staining Solution</i>	Becton, Dickinson and Company	Franklin Lakes, NJ, USA
SAC, <i>insoluble, Cowan Strain</i>	Sigma Aldrich by Merck	St. Louis, MO, USA
Tween 20 (Calbiochem®)	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland

Tabelle 2-3: Zellkultur-Zusätze.

2.4 Durchflusszytometrie

Bezeichnung	Klon	Konjugat	Verdünnung	Hersteller	Herstellersitz
AnnexinV	-	FITC	1:20	Becton, Dickinson and Company	Franklin Lakes, NJ, USA
<i>AnnexinV-Binding-Buffer</i>	-	-	10x Konzentrat	Becton, Dickinson and Company	Franklin Lakes, NJ, USA
CD138	44F9	Vio-Blue	1:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
CD19	LT-19	VioBlue	1:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
CD21	HB5	PerCP-Vio700	1:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
CD27	M-T271	APC	1:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
CD38	REA671	PE	1:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
CD73	AD2	PE-Vio770	1:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland

Bezeichnung	Klon	Konjugat	Verdünnung	Hersteller	Herstellersitz
<i>FcR Blocking Reagent</i>	-	-	1:5	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
IgD	IgD26	FITC	1:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Mouse IgG1	IS5-21F5	VioBlue	1:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Mouse IgG1	IS5-21F5	APC	1:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Mouse IgG1	IS5-21F5	FITC	1:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Mouse IgG1	IS5-21F5	PE-Vio770	1:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Mouse IgG2a	S43.10	PerCP-Vio700	1:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Propidium-jodid	-	-	1:100	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
REA Control (S)	REA293	PE	1:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland

Tabelle 2-4: Antikörper für Durchflusszytometrie.

2.5 Technische Geräte und Software

Bezeichnung	Geräte-/Software name	Hersteller	Herstellersitz
Absaugsystem	<i>Aspirator with trap flask</i>	Kisker Biotech	Steinfurt, Deutschland
Analysenwaage	ABT-120-5DM	Kern	Balingen, Deutschland
Autoklav	Systec VX-55	Systec	Linden, Deutschland
Durchflusszytometrie	MACS- Quant Analyzer 10	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
ELISA-Gerät	<i>iMark® Multiplate Absorbance Reader</i>	BioRad	Hercules, CA, USA
Inkubator	<i>Heraeus Function Line</i>	Heraeus	Hanau, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr Comfort (4°C)	Liebherr	Biberach an der Riß, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr Premium (4°C)	Liebherr	Biberach an der Riß, Deutschland
Kühlschrank	Thermoscientific GPS Series (4°C)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Kühlschrank	Liebherr Medline (-20°C)	Liebherr	Biberach an der Riß, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr Premium (4°C)	Liebherr	Biberach an der Riß, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr Premium no frost (4°C)	Liebherr	Biberach an der Riß, Deutschland
Mikroskop	Zeiss Axio	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Multikanal-Pipette	Transferpette-8 (50-200µl)	Brand	Wertheim, Deutschland
Multikanal-Pipette	Xplorer (50-1200µl)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

Bezeichnung	Geräte-/Software name	Hersteller	Herstellersitz
Neubauer-Zählkammer	Neubauer- Zählkammer, Tiefe 0,1mm, 0,0025mm	Brand	Wertheim, Deutschland
Parafilm	Parafilm	Bemis	Neenah, WI, USA
Pipetten	Pipetten 100-1000µl; 10-100µl; 0,5-10µl	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Pipetten	Stepper Multipette® M4 1µl - 10ml	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Pipetteur	Pipetus- Akku	Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt, Deutschland
Schüttler	<i>LSE Digital Microplate Shaker</i>	Corning	Corning, NY, USA
Software (Analyse der FACS-Daten)	FlowJo™ (Version 10.2, 02.09.2016)	Becton, Dickinson and Company	Ashland, OR, USA
Software (ELISA)	<i>Microplate Manager®</i> Software	BioRad	Hercules, CA, USA
Software (Graphiken)	SigmaPlot 12.5	Systat Software Incorporation	Chicago, IL, USA
Software (Schreibprogramm)	Microsoft Word 2016	Microsoft Corporation	Redmont, WA, USA
Software (Statistik)	SPSS 24	IBM Corporation	Armonk, NY, USA
Software (Statistik)	R	The R Foundation	
Software (Tabellenprogramm)	Microsoft Excel 2016	Microsoft Corporation	Redmont, WA, USA
Statistische Analysesoftware	SPSS 24	IBM Corporation	Armonk, NY, USA
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex Super	Bandelin	Berlin, Deutschland
Vortexer	Reax 2000	Heidolph	Schwabach, Deutschland
Wärmebad	GFL 1092	GFL	Burgwedel, Deutschland
Werkbank	LaminAir HB2472	Heraeus	Hanau, Deutschland
Zentrifuge	<i>Mini-Centrifuge</i> NG002B	Nippon Genetics	Tokyo/Kyoto, Japan
Zentrifuge	Microzentrifuge CT15RE	Hitachi Koki Co Ltd	Tokyo, Japan
Zentrifuge	Zentrifuge Megafuge 1.0 (Heraeus Sepatech)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA

Tabelle 2-5: Technische Geräte.

2.6 ELISA

Bezeichnung	Hersteller	Herstellersitz
<i>Anti-ds-DNA screen (IgG,A,M)</i>	orgentec	Mainz, Deutschland
<i>Anti-ds-DNA (IgA)</i>	orgentec	Mainz, Deutschland
<i>Anti-ds-DNA (IgM)</i>	orgentec	Mainz, Deutschland
<i>Anti-ds-DNA (IgG)</i>	orgentec	Mainz, Deutschland
<i>Corning Costar 9018 (96 well plates)</i>	Corning	Corning, NY, USA
<i>Nunc F96 Maxisorp Nunc-Immuno Plates</i>	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
<i>Human IgG ready-set-go</i>	Affymetrix (Thermo Fisher Scientific™)	Santa Clara, CA, USA
<i>Human IgM ready-set-go</i>	Affymetrix (Thermo Fisher Scientific™)	Santa Clara, CA, USA
<i>Human IL-10 ready-set-go</i>	Affymetrix (Thermo Fisher Scientific™)	Santa Clara, CA, USA

Tabelle 2-6: ELISA-Kits.

2.7 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Herstellersitz
<i>Caffeine powder 5g</i>	Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA
H ₂ SO ₄ (1M)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (10000 IU/ml, 10000 µg/ml)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA

Tabelle 2-7: Chemikalien.

2.8 RNA

Bezeichnung	Hersteller	Herstellersitz
Buffer RLT (RNEasy Lysis Buffer)	Qiagen	Venlo, Niederlande; Hilden, Deutschland
QIAshredder	Qiagen	Venlo, Niederlande; Hilden, Deutschland
RNEasy Mini Kit	Qiagen	Venlo, Niederlande; Hilden, Deutschland

Tabelle 2-8: RNA-Zubehör.

3 Methoden

Der Einsatz aller verwendeten Materialien erfolgte nach Herstellerangaben. Patienten gaben ihre informierte Zustimmung für die zusätzliche Abnahme von Blut für das Projekt.

3.1 Ethische Aspekte

Die Studie sowie die Vorarbeiten hierfür wurden im Einvernehmen mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt und von der lokalen Ethikkommission genehmigt. Im Rahmen der Probensammlung wurde Blut für die Biobank RHINEVIT gesammelt (Studiennummer 4711, 11.06.2014). Aus diesem gesammelten Pool sollen Proben für zukünftige Studien bereitgestellt werden können, die jeweils separat von der Ethikkommission genehmigt werden müssen. Für unsere Studie bezeichnet dies das Votum mit der Studiennummer 5466R (20.04.2016).

Die Studie erfolgte nach Aufklärung und informierter schriftlicher Zustimmung der Patienten. Es wurde ihnen ein Beenden der Teilnahme an der Studie zu jedem Zeitpunkt und ohne Angabe von Gründen ermöglicht. Nichtteilnehmern der Studie entstanden keine Nachteile in der Behandlung, Teilnehmern der Studie keine Vorteile. Die erhobenen klinischen Daten und Befunde wurden in anonymisierter Form elektronisch gespeichert.

Für die gesunden Kontrollen wurden *buffy coats* von Blutspendern der Universitätsklinik Düsseldorf (Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin) erworben.

3.2 Blutgewinnung

Neben Buffy coats von 15 gesunden Blutspendern wurden für die Studie insgesamt 30 SLE Patienten rekrutiert, die alle einen Systemischen Lupus Erythematoses nach den Kriterien des *American College of Rheumatology* aufwiesen. Die Patienten kamen zu einem regulären Termin in die Ambulanz der rheumatologischen Abteilung am Universitätsklinikum Düsseldorf (UKD, Moorenstraße 5, 40225 Düsseldorf), wo nach ihrer Aufklärung über das Projekt und anschließenden schriftlichen Einverständniserklärung ca. 30 ml EDTA-Blut mittels einer *Vacutainer Safety-Lok-Butterfly*-Kanüle zusätzlich zum angeordneten Labor, aber ohne zusätzliche Punktion, vom Arzt entnommen wurde. Das Blut wurde in einer Transportbox (*Clearly Safe DuraPorter Sample Carrier* von Heathrow Scientific LLC, Vernon Hills, IL, USA) von der rheumatologischen Ambulanz zum Hiller-Forschungszentrum (im *Life Science Center*, Merowingerplatz 1a, 40225 Düsseldorf) transportiert, wo es sofort verarbeitet wurde. Patienten, die in den letzten 18 Monaten eine B-Zell-depletierende Therapie (z.B. in Form von Rituximab) oder Cyclophosphamid erhalten hatten oder zum Blutentnahmezeitpunkt schwanger waren, wurden nicht in die Studie miteingeschlossen.

3.3 B-Zell-Separation

3.3.1 Methode und Prinzip

Aus dem Vollblut wurde unter sterilen Bedingungen die reine B-Zellpopulation mittels Dichtegradienten-Zentrifugation sowie magnetischer Markierung aller Nicht-B-Zellen gewonnen. Durch die Dichtegradienten-Zentrifugation entsteht ein Leukozytenring mit peripheren mononukleären Zellen (PBMCs), der abgenommen wird und nach zweimaligem

Waschen werden alle Nicht-B-Zellen mit biotinylierten Antikörpern (gegen CD2, CD3, CD4, CD14, CD15, CD16, CD34, CD56, CD61, CD235a (Glycophorin A) und FcεRIa) markiert. Dann werden magnetische *Beads*, die das Biotin der Antikörper binden, hinzugegeben und die Zellen an einer magnetischen Säule vorbeigeführt. Dabei bleiben die magnetisch markierten Nicht-B-Zellen an der Säule hängen und im Überstand fängt man die B-Zellpopulation auf. Die so gewonnenen B-Zellen werden gezählt, auf die Subpopulationen hin untersucht und in Medium à 100.000 Zellen ausgesät.

3.3.2 Durchführung

Die B-Zell-Separation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die insgesamt maximal 30 ml Vollblut wurden unter sterilen Bedingungen verarbeitet. Für die Dichtegradientenzentrifugation wurde das Blut zunächst 1:2 mit *Macs Quant Running Buffer* verdünnt. Ein 50ml Leucosep- Röhrchen, das eine Membran enthält, wurde mit 15 ml Lymphoprep gefüllt und eine Minute bei Raumtemperatur bei 1000g zentrifugiert. Dadurch passiert das Lymphoprep die Membran. Anschließend wird das verdünnte Blut hinzugegeben und bei 800g und Raumtemperatur für 15 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Das Lymphoprep aggregiert die Erythrozyten, diese sammeln sich durch die Zentrifugation aufgrund ihrer Dichte unten im Röhrchen und zwischen Serum und Lymphoprep bildet sich ein Ring mit den PBMCs, der erhalten bleibt, da die Zentrifuge nicht abgebremst wird. Nach Absaugen des Serums wird dieser Ring in ein neues Falcon dekantiert, mit *Running Buffer* auf 50 ml aufgefüllt und auf diese Weise zweimal gewaschen. Dabei wurde nach dem ersten Waschen der Überstand nicht verworfen, sondern erneut gewaschen, um auch daraus möglichst viele Zellen zu extrahieren.

Nachdem die Zellen in ein gemeinsames Röhrchen überführt wurden, wurden sie in einer 1:400 Verdünnung im *Macs Quant Analyzer 10* gezählt. Zum Prinzip der Zählung im FACS s. 3.5 Durchflusszytometrie. Dazu wurden die Zellen auf 10 ml mit *Running Buffer* aufgefüllt (1:10 Verdünnung), die Zellen gevortext, und zu 390 µl *Running Buffer* wurden 10 µl der B-Zellen hinzugefügt (1:40 Verdünnung). In diesem Gefäß wurden die Zellen gezählt. Alternativ wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer (Brand, Wertheim Deutschland) gezählt. Dazu wurden 10 µl von der Zellsuspension in die Neubauer-Zellkammer (0,1 mm * 0,0025 mm pro Kleinstquadrat) gegeben und alle vier Großquadranten ausgezählt. Von diesen wurde das arithmetische Mittel bestimmt. Danach wurde die Gesamtzellzahl in den 10 ml Gesamtvolumen nach folgender Formel bestimmt:

$$Zellzahl_{gesamt} = \text{arithmetisches Mittel} \times 10^5$$

Nach dem Zählen wurden die PBMCs für 10 Minuten bei 8°C und 300g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

Die anschließende Isolierung der B-Zell-Population erfolgte durch magnetische Markierung aller Nicht-B-Zellen mittels des *Pan-B-cell-Isolation-Kits* (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach). Dazu wird je 10⁷ PBMCs zunächst 40 µl *Running Buffer* sowie 10 µl Biotin-Antikörper-Cocktail hinzugefügt. Der Cocktail enthält biotinylierte Antikörper, die alle Nicht-B-Zellen markieren. Nach 5 minütiger Inkubation (bei 4°C und im Dunkeln) gibt man pro 10⁷ Zellen 30 µl *Running Buffer* hinzu und 20 µl *Anti-Biotin-Microbeads*. Die

Microbeads binden während einer 10-minütigen Inkubation (bei 4°C und im Dunkeln) die biotinylierten Antikörper und markieren somit die Zellen magnetisch.

Für den Separationsvorgang wurden LS-Säulen verwendet sowie ein *Preseparation Filter* mit 30 µm Netzgröße, um eventuell verklumpte Zellen voneinander zu lösen. Die Säule wurde mit 3 ml *Running Buffer* equilibriert, und diese Flüssigkeit verworfen. Dann wurden die markierten Zellen auf einmal über die Säule gegeben und in einem neuen Tube aufgefangen, das ursprüngliche PBMC-Zelltube mit 2 ml *Running Buffer* gespült und ebenfalls über die Säule gegeben sowie die Säule zweimal mit je 2 ml gespült. Die so gewonnene B-Zellpopulation wurde nach o.g. Verfahren gezählt, um anschließend die B-Zellen mit 100.000 Zellen in vorher angesetztem Medium (RPMI, 25mM Hepes, 5 % hitzeinaktiviertes FBS, 5 µg/ml Insulin human) auf einer 96-well-Platte (Greiner Cellstar) in 100 µl auszusäen und in Kultur zu bringen. Nicht benutzte Näpfe wurden mit 200 µl PBS aufgefüllt.

3.4 Stimulation

Die ausgesäten Zellen wurden mit Zytokinen in folgenden Konzentrationen stimuliert:

Stimulus	Konzentration/Verdünnungsverhältnis
Kontrolle	enthält PBS 1:40
BAFF	50 ng/ml
CpG	2,5 µg/ml
SAC	1:20.000
CD40	5 µg/ml
IL-2	2 ng/ml
IL-4	1 ng/ml
IL-21	10 ng/ml
Coffein low	0,1 µg/ml
Coffein high	50 µg/ml
NECA high	10 ⁻⁷ mol/l
NECA medium	10 ⁻⁸ mol/l
NECA low	10 ⁻¹⁰ mol/l

Tabelle 3-1: Konzentrationen der Stimuli

Die Stimulanzen wurden einzeln oder in Kombination in den o.g. Konzentrationen gelöst, und in einem Volumen von 100 µl zu den B-Zellen gegeben, sodass das Endvolumen pro Napf 200 µl beträgt.

Nach Stimulation wurden die Zellen für 6 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ im Inkubator *Heraeus Function Line* (Heraeus, Hanau, Deutschland) inkubiert.

3.5 Durchflusszytometrie

3.5.1 Methode und Prinzip

FACS – *Fluorescence Activated Cell Sorting*

Bei der durchflusszytometrischen Analyse werden Zellen einzeln durch eine Kapillare an einem Laserstrahl vorbei gelenkt. Dabei streuen die Zellen abhängig von Größe und Granularität das Licht vorwärts und seitwärts, wobei das Vorwärtsstreulicht (*FSC= forward scatter*) mit der Größe und das Seitwärtsstreulicht (*SSC= sideward scatter*), welches das Licht im 90° Winkel streut, mit der Granularität der Zelle korrelieren. Das Streulicht wird

mittels Detektoren (*PMT= photomultiplier tubes*) nachgewiesen und die Daten in einem *Dot Plot* (Punktewolke) dargestellt. Auf diese Weise können auch ungefärbt die Zellen des Blutes morphologisch grob unterschieden werden.

Die Zellen werden mit Antikörpern gefärbt, welche mit Fluorochromen konjugiert sind. Die Fluorochrome werden durch den Laser angeregt und emittieren Licht, welches von den *PMT* gemessen wird. Die Emissionsspektren unterscheiden sich zwischen den Fluorochromen und so sind gleichzeitige Mehrfachfärbungen möglich.

Im vorliegenden Experiment wurde vor den Messungen zunächst eine Kompensation vorgenommen. Dazu wurden frische B-Zellen einzeln mit den 6 verschiedenen verwendeten Fluorochromen gefärbt und an diesen die Kompensation vollzogen, um Überschneidungen in den Emissionsspektren zu kompensieren.

Für die Bestimmung der Subpopulationen wurden die B-Zellen an Tag 0 auf verschiedene Oberflächenmarker untersucht. Ferner wurde an Tag 6 die Viabilität mit den Markern Propidiumjodid und AnnexinV bestimmt. Lebende Zellen besitzen das Phospholipid Phosphatidylserin auf der Innenseite ihrer Membran. Bei Apoptose gelangt das Phosphatidylserin auch auf die Außenseite der Membran, wo es von AnnexinV gebunden wird. Nekrotische Zellen haben eine perforierte Membran, wodurch AnnexinV auch nekrotische Zellen markiert. Deshalb wird zur Unterscheidung apoptotischer von nekrotischen Zellen zusätzlich Propidiumjodid hinzugefügt; dieses durchdringt nur die perforierte Membran nekrotischer Zellen, gelangt aber nicht in apoptotische Zellen. Anhand dieser beiden Marker wurde eine Unterscheidung in *living* (AnnexinV -, PI-), *early apoptotic* (AnnexinV +, PI -), *late apoptotic* (AnnexinV +, PI +) und *nekrotic* (AnnexinV -, PI +). Zur Interpretation wurden *early* und *late apoptotic* inhaltlich zusammengefasst.

Die Messung wurde mit dem *Macs Quant Analyzer 10* vorgenommen. Das Gerät verfügt über drei verschiedene Laser und insgesamt 8 Kanäle: Violett (405 nm) mit 2 Kanälen für VioBlue und VioGreen, Blau (488 nm) mit 4 Kanälen für FITC, PE, PerCP/PerCP-Vio700 und PE-Vio770 sowie Rot (635 nm) mit 2 Kanälen für APC und APC-Vio770. Folgende Farbstoffe wurden verwendet: VioBlue, Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Perdinin Chlorophyll-Protein-Vio700 (PerCP-Vio700), Allophyocyanin (APC) und PE-Vio770.

Vor der eigentlichen Färbung mit den Antikörpern wurden die Zellen mit *FcR Blocking Reagent* (Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) 10 Minuten vorinkubiert, um mögliche unspezifische Bindungen am FcR-Fragment zu vermeiden. Alle Antikörper wurden von Miltenyi Biotech GmbH (Bergisch Gladbach, Deutschland) bezogen. Der Farbcocktail wurde nach Herstellerangaben im Verhältnis 1:11 auf die Zellen gegeben und nach Inkubation im Kühlschrank wieder ausgewaschen. Unmittelbar nach der Färbung erfolgte die Messung am FACS-Gerät.

3.5.2 Gating Strategie

Für die Analyse der FACS-Daten (Subpopulationen, Viabilität, Reinheit) wurde die Software *FlowJo* (Version 10.2, Tree Star Inc, Ashland, OR, USA) verwendet.

Die *Gating*-Strategie für die Subpopulationen umfasste ein B-Zell-Gate anhand FSC und SSC sowie darauffolgendes *Gating* in die verschiedenen Subpopulationen anhand der Isotypkontrollen (s. Abbildung 3-1 und Abbildung 3-2). Da Daten für ein Gating von Zellklumpen, sog. Dubletten, nur für einen Teil der Proben vorlagen, wurde in dieser Studie zu Gunsten einer einheitlichen Auswertung darauf verzichtet.

Die einzelnen Schritte für das *Gating* der Subpopulationen sind in Abbildung 3-1 und Abbildung 3-2 ersichtlich: nach Eingrenzung der B-Zellen anhand FSC und SSC erfolgte eine schrittweise Einteilung in Marker exprimierend (+) oder nicht-exprimierend (-). Die Grenze hierfür wurde an nichtfärbenden Isotypkontrollen gesetzt. In den Vier-Quadranten-Gates sind die jeweiligen Subpopulationen mit einem roten Rahmen markiert; für einen direkten Vergleich sind HC und SLE gegenübergestellt.

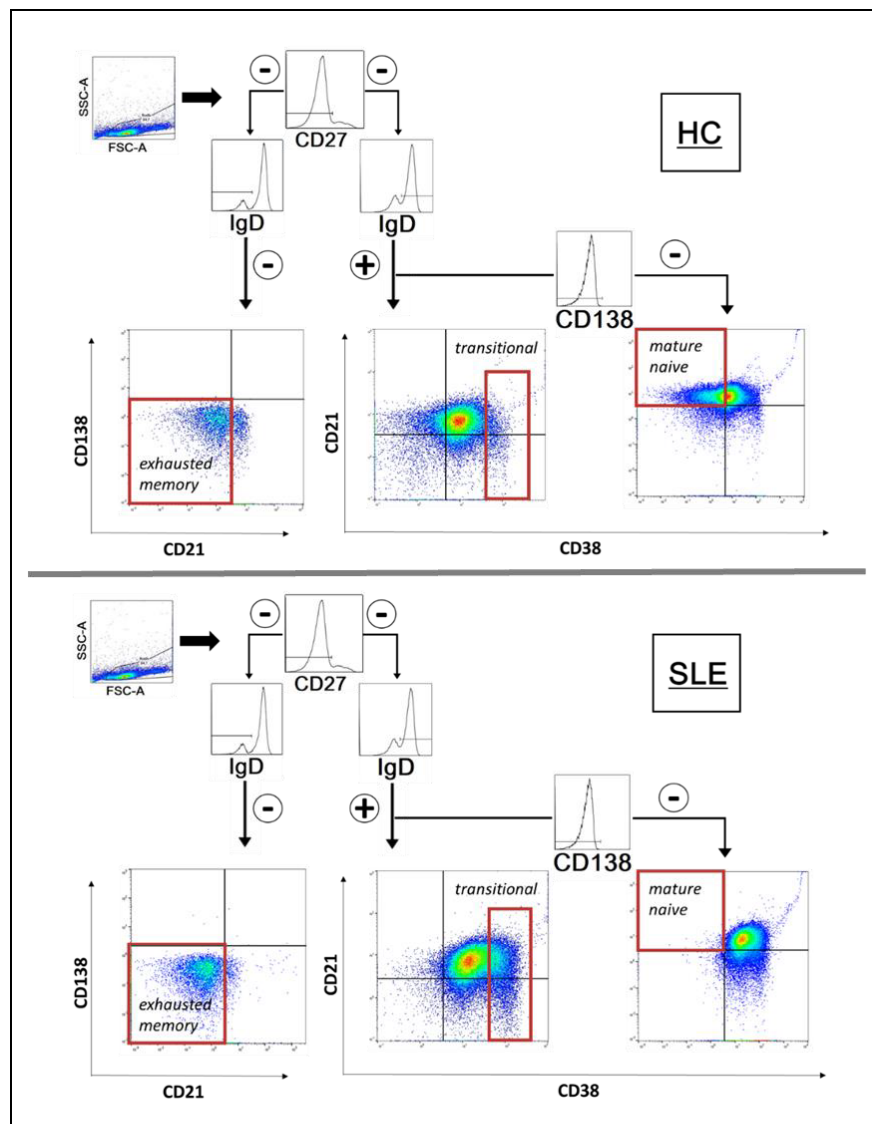


Abbildung 3-1: Einordnung der Subpopulationen *exhausted memory*, *transitional* und *mature naive* B-Zellen anhand der Oberflächenmarker sowie beispielhafte Gegenüberstellung bei HC (oben) und SLE (unten). Eingrenzung der B-Zellen anhand *Forward scatter* und *Sideward scatter*, anschließende Unterteilung in IgD+ oder IgD-. Die IgD- Zellen wurden nach CD138 und CD21 unterschieden (*exhausted memory*). Die IgD+ Zellen wurden entweder direkt oder nach Selektion nur der CD138- weiter nach CD21 und CD38 unterschieden (*transitionals*, *mature naive*).

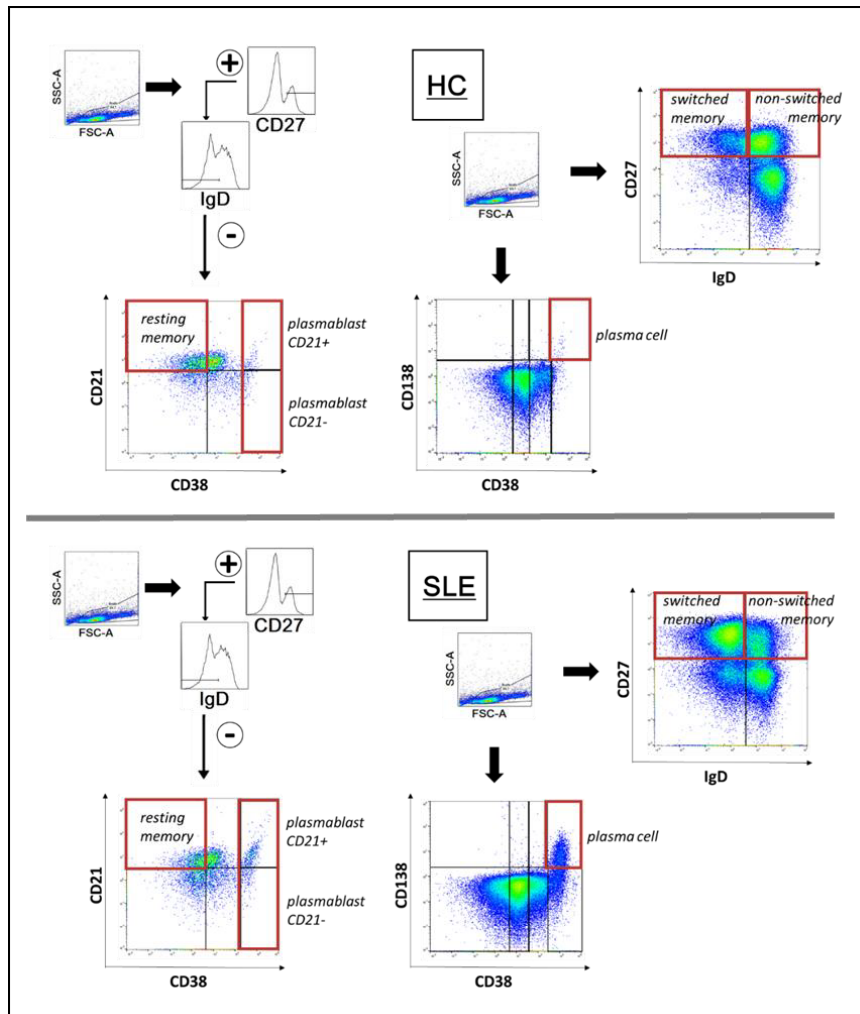


Abbildung 3-2: Einordnung der Subpopulationen *resting memory*, *plasmablast*, *switched memory* und *non-switched memory* anhand der Oberflächenmarker sowie beispielhafte Gegenüberstellung bei HC (oben) und SLE (unten). Eingrenzung der B-Zellen anhand *Forward scatter* und *Sideward scatter*, anschließende Selektion der CD27+ und IgD- Zellen mit Unterscheidung nach CD21 und CD38 (*resting memory* und *plasmablasts*). Direkte Eingrenzung der *plasmacells* anhand CD38 und CD138 sowie der *switched memory* und *non-switched memory* anhand CD27 und IgD.

Für die Messung der Viabilität (*early apop*, *late apop*, *living*) am Tag der Überstandsernte wurde Zellschrott mit Hilfe von FSC und SSC aus der Auswertung ausgeschlossen. Ein Dubletten-Gating erfolgte hier aus o.g. Gründen ebenfalls nicht.

3.5.3 Durchführung

Die durchflusszytometrische Messung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. An Tag 0 wurden insgesamt vier Messungen durchgeführt: CD19 samt Isotypkontrolle sowie der Cocktail für die Subpopulationsfärbung (CD21, CD27, CD38, CD73, CD138 und IgD) samt Isotypkontrolle. Jede der vier Messungen wurde in einem separaten Gefäß durchgeführt. Die Färbung der Subpopulationen erfolgte an 10^5 B-Zellen, die CD19-Färbung an den Zellen, die für die Zählung verwendet wurden (1:400-Verdünnung).

Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 300g und 4°C zentrifugiert. Folgend wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit *FcR Blocking Reagent* (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) im Verhältnis 1:5 (10 µl *FcR Block* zusammen mit 40 µl *Macs Quant Running Buffer* mit BSA) für 10 Minuten bei 4°C im Dunkeln vorinkubiert.

Anschließend wurden je 5 µl des entsprechenden Antikörpers hinzugefügt und für weitere 10 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 300g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 200 µl *Macs Quant Running Buffer* mit BSA resuspendiert. Die Proben wurden direkt im Anschluss im FACS-Gerät gemessen.

Für die Viabilitätsbestimmung an Tag 6 nach Stimulation wurden die Zellen nach Abnahme von 175 µl Zellkulturüberständen zweimal mit 100 µl kaltem PBS gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Zellen jeweils für 10 Minuten bei 300g bei 4°C zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt. Danach wurden die Zellen in je 100 µl *Annexin-Binding-Buffer (1x)* resuspendiert und 5 µl AnnexinV pro Napf hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden die Zellen erneut mit 100 µl *Annexin-Binding-Buffer (1x)* resuspendiert und anschließend im *Macs Quant Analyzer 10* gemessen. Das Gerät fügt unmittelbar vor der Messung Propidiumjodid im Verhältnis 1:100 selbst hinzu. Anhand der Bindung von AnnexinV und PI kann eine Einteilung in *living* (AnnexinV und PI negativ), *early apoptotic* (AnnexinV positiv, PI negativ), *late apoptotic* (AnnexinV und PI positiv) sowie *necrotic* (Annexin negativ, PI positiv) getroffen werden. Zur Interpretation werden *early* und *late apoptotic* später inhaltlich zusammengefasst.

3.6 ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

Es wurden die Konzentrationen von anti-ds-DNA-Antikörpern (vom Typ IgG, IgM, IgA), IgG, IgM und IL-10 in den Überständen mit kommerziell erhältlichen ELISAs gemessen, wobei die Herstellerangaben zur Durchführung befolgt wurden. Für die Messung wurde der *iMark® Multiplate Absorbance Reader* (BioRad, Hercules, CA, USA) sowie die *Microplate Manager®* Software (BioRad, Hercules, CA, USA) verwendet. Bei dem IgG, IgM und IL-10-ELISA wurden hochbindende *Corning Costar 9018 96 well plates* verwendet. Für den *anti-ds-DNA-ELISA* wurden die mitgelieferten *ELISA-strips* verwendet.

3.6.1 Prinzip

Der anti-ds-DNA-ELISA (orgentec, Mainz, Deutschland) beruht auf dem Prinzip des indirekten ELISAs. Auf den mitgelieferten Streifen ist humane rekombinante ds-DNA an die Mikrowells gebunden. Nach Zugabe der Probe können vorhandene anti-ds-DNA-Antikörper der Typen IgG, IgM sowie IgA binden. Nach einem Waschschrift zum Entfernen überschüssiger Antikörper bindet ein mit dem Enzym HRP konjugiertes-anti-human-IgG (polyklonales IgG vom Kaninchen) die gebundenen Antikörper. Erneutes Waschen entfernt überschüssigen konjugierten Antikörper. Nun hinzugegebenes TMB als Enzymsubstrat wird von der HRP zu einem blauen Hydrolysat umgewandelt. Eine Säure stoppt die Reaktion und führt zu einem Farbumschlag nach gelb.

Die IgG- und IgM-ELISAs (affymetrix, Santa Clara, CA, USA) basieren auf dem Sandwich-Prinzip. Am Vortag erfolgt das Beschichten der hochbindenden Platten mit einem *Capture Antibody* (vortitriertes und purifiziertes anti-human-IgG bzw. -IgM). Am nächsten Tag werden die Mikrowells nach einem Waschschrift geblockt, um unspezifische Bindungen am Fc-Fragment zu vermeiden. Nach erneutem Waschen werden die Proben appliziert; während der Inkubationszeit können die in der Probe vorhandenen Antikörper den *Capture Antibody*

binden. Nach einem weiteren Waschgang wird ein mit HRP konjugierter anti-human-IgG/IgM-Antikörper (*Detection Antibody*) hinzugefügt. Somit liegt das zu detektierende Immunglobulin nun zwischen zwei Antikörpern- daher der Name Sandwich-ELISA. Nachdem der *Detection Antibody* gebunden hat, wird überschüssiger Antikörper herausgewaschen und das Substrat TMB hinzugefügt. Das Enzym HRP setzt das Substrat um und ruft eine blaue Farbreaktion hervor. Nach 15 Minuten wird diese Reaktion mit einer Säure (Schwefelsäure) gestoppt, was zu einem gelben Farbumschlag führt (s. Abbildung 3-3).

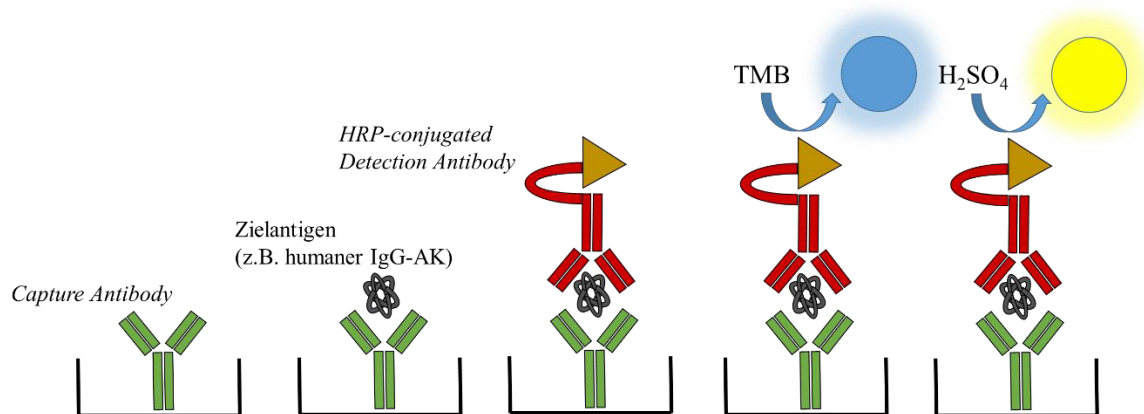


Abbildung 3-3: Prinzip eines Sandwich-ELISAs. Der *Capture Antibody* bindet das in der Probe enthaltene Zielantigen, hier Immunglobulin G oder M. Anschließend bindet ein mit dem Enzym HRP (*Horse Radish Peroxidase*) konjugierter Antikörper (*Detection Antibody*) das Zielmolekül. TMB wird von der HRP umgesetzt und ein blauer Farbumschlag entsteht. Anschließend wird die Reaktion durch Hinzufügen von Säure gestoppt.

Der IL-10 ELISA (affymetrix, Santa Clara, CA, USA) ist ebenfalls ein Sandwich-ELISA. Der Unterschied zu den oben beschriebenen IgG und IgM-ELISAs besteht darin, dass der *Detection Antibody* (anti-human-IL-10-Biotin) nicht mit einem Enzym, sondern mit Biotin gekoppelt ist. Das Enzym (Avidin-HRP) wird nach einem Waschgang erst in einem zusätzlichen Schritt hinzugefügt, bindet den *Detection Antibody* und kann nach erneutem Waschen das Substrat TMB umsetzen.

3.6.2 Anti-ds-DNA-ELISA: Durchführung

Da die Platten schon mit humaner ds-DNA beschichtet sind, können die Proben und der Standard mit je 50 µl sofort aufgetragen werden. Zuvor wurden die im Kit mitgelieferten Standards angepasst. Der mitgelieferte Standard reicht von 12,5 IU/ml („Calibrator B“) bis 200 IU/ml („Calibrator F“) und umfasst ferner eine Negativ- und eine Positivkontrolle. Da der Standard für unseren Ansatz von 1,56 IU/ml bis 25 IU/ml reicht, wurden 1:2 Verdünnungen vom „Calibrator B“ angesetzt. Nach Auftragen von Proben und Standards wurde 30 Minuten abgedeckt bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde mit dem mitgelieferten *Wash*, der nach Herstellerangaben 1:50 verdünnt wurde, die Platte dreimal gewaschen. 50 µl von nun hinzugefügtem Enzym-Konjugat können die gebundenen anti-ds-DNA-Antikörper markieren. Nach 15 minütiger Inkubation wird überschüssiges Enzym in drei Waschsritten ausgewaschen und 50 µl TMB hinzugefügt. Nach 15 minütiger Inkubation im Dunkeln wird die Reaktion mit 1M Schwefelsäure gestoppt. Die Extinktion wird bei 450 nm gemessen.

3.6.3 IgG/IgM-ELISA: Durchführung

Die Platte wird mit 100 µl pro Napf beschichtet. Dazu wird der mitgelieferte *Coating Buffer* nach Herstellerangaben 1:10 verdünnt und anti-human-IgG- bzw. anti-human IgM-Antikörper (*Capture Antibody*) 1:250 verdünnt hinzugefügt. Die Platte wird über Nacht bei 4°C abgedeckt inkubiert. Am nächsten Tag wird die Platte mit der Waschlösung PBS + 0,05 % Tween 20 zweimal gewaschen. Für den Block wurde der mitgelieferte *Assay Buffer A (20x)* nach Herstellerangaben 1:10 verdünnt, je 250 µl pro Vertiefung aufgetragen und die Platte abgedeckt bei 4°C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde zunächst der Standard aus den mitgelieferten Lyophilisaten angesetzt. Für den IgG-ELISA bedeutet dies, dass zunächst die Ampulle mit IgG-Lyophilisat in 550 µl deionisiertem Wasser gelöst wird. Dieser Standard hat eine Konzentration von 200 ng/ml. Von diesem Standard werden nun 1:2 Verdünnungen angesetzt, sodass man auf eine Detektionsbreite von 1,56-100 ng/ml für den ELISA kommt. Als Leerwert diente der mitgelieferte *Assay Buffer A (1x angesetzt)*.

Für den IgM-ELISA wurde das IgM-Lyophilisat in 340 µl deionisiertem Wasser gelöst. Dieser Standard hat eine Konzentration von 2000 ng/ml. Für die Verdünnungsreihe wurde von dem Standard eine 1:2 Verdünnung (für den höchsten Standard) und nachfolgend 1:3 Verdünnungen angesetzt. Somit reicht die verwendete Spanne von 1000-1,37 ng/ml. Auch hier diente als Leerwert *Assay Buffer A (1x angesetzt)*.

Nach Ansetzen des Standards wurden die Platten zweimal gewaschen und der Standard mit je 50 µl pro Vertiefung pipettiert sowie die Proben in einer 1:2 Verdünnung mit *Assay Buffer A (1x angesetzt)*. Die Platten wurden abgedeckt auf einem Schüttler bei 400 rpm zwei Stunden inkubiert. Anschließend, nach vier Waschschritten, wurde ein mit HRP konjugierter anti-IgG- bzw. anti-IgM-Antikörper (*Detection*) nach Herstellerangaben 1:250 verdünnt und zu je 100 µl hinzugefügt. Die Platten wurden für eine Stunde auf dem Schüttler bei 400 rpm inkubiert. Nach erneutem viermaligem Waschen wurde das Substrat TMB mit je 100 µl hinzugefügt, 15 Minuten im Dunkeln inkubiert und dann mit je 100 µl 1 M Schwefelsäure die Reaktion gestoppt. Die Extinktion wurde bei beiden ELISAs bei 450 nm gemessen.

3.6.4 IL-10-ELISA: Durchführung

Das Beschichten der zum Kit gehörigen Platten erfolgte mit einem *Capture Antibody* zu 100 µl pro Vertiefung. Dazu wurde *Coating Buffer* nach Angaben des Herstellers 1:10 verdünnt, um dann den *Capture Antibody* 1:250 verdünnt hinzuzufügen. Die Inkubation erfolgt abgedeckt bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Platte dreimal mit der Waschlösung PBS + 0,05 % Tween 20 gewaschen. dann mit beiliegendem *Diluent*, der 1:5 verdünnt wurde, für 1 Stunde geblockt, um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen. Währenddessen wurde der Standard mit dem beiliegenden IL-10-Lyophilisat angesetzt. Dazu wurde das Lyophilisat nach Herstellerangaben auf eine Konzentration von 15.000 pg/ml in 1 ml *Diluent* gelöst. Dieses wurde anschließend 1:60 verdünnt, um eine Konzentration von 250 pg/ml als höchsten Standard zu erreichen. Mit diesem wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe angelegt, um einen Standard von 250 bis 3,9 pg/ml zu generieren. Für den Nullwert wurde *Diluent* verwendet.

Nach einem Waschschrift wurden der Standard zu je 50 μ l, die mit *Diluent* 1:2 verdünnten Proben (Gesamtvolumen ebenfalls 50 μ l) auf die Platten aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (*LSE Digital Microplate Shaker* von Corning, Corning, NY, USA) bei 400 rpm.

Nach fünfmaligem Waschen erfolgte die Applikation des *Detection Antibody* mit je 50 μ l, der hierzu in *Diluent* 1:250 verdünnt wurde. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur und fünfmaligem Waschen wurde das mit Avidin konjugierte Enzym HRP mit je 50 μ l pro Mikrowell hinzugegeben, welches ebenfalls zuvor 1:250 in *Diluent* verdünnt wurde. Nach 30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte ein siebenmaliges Waschen. Bei diesem Waschen ließ man die Waschlösung jedes Mal 1-2 Minuten einwirken.

Anschließend wurden je 50 μ l TMB hinzugefügt und 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden 25 μ l von 1M H₂SO₄ hinzugefügt.

3.7 Statistische Auswertung

3.7.1 Analyse Durchflusszytometrie

Für die statistische Analyse der Subpopulationsdaten wurde SPSS 24 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) verwendet. Es wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test zum Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ verwendet.

3.7.2 Zellkultur-Daten (Ergebnisse der ELISA)

Für einen Überblick erfolgten die Gruppenvergleiche (SLE gegen HC, gerechnet mit der Statistik-Software R, Version 3.6.1) bezüglich der Parameter dsDNA IgG, dsDNA IgM, IgG, IgM, IL-10 und Apoptosewerte (*early apoptotic*, *late apoptotic*, *living*) mittels t-Tests. Da die Parameter verschiedene Messskalen aufwiesen (Konzentrationen für Antikörper und Prozentwerte für Apoptosewerte), wird als Effektmaß die SMD (*Standardized Mean Difference*) berichtet (77). Die SMD drückt das Ausmaß des Effektes standardisiert auf die Standardabweichung der gesamten Probandengruppe aus.

$$SMD = \frac{\text{Mittelwert}_{SLE} - \text{Mittelwert}_{HC}}{\text{Standardabweichung}_{gesamt}}$$

Sie beschreibt als Effektmaß die Anzahl Standardabweichungen, die beide Gruppen in einem bestimmten *Outcome* voneinander unterscheidet. Auch hier wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ gewählt.

Für die Dose-Response-Analyse wurden linear-gemischte Regressionsmodelle (LMM) gerechnet, um für Alters- und Geschlechtseffekte zu adjustieren. Ferner wurde eine Adjustierung an die (mit CD19 gemessene) Reinheit der B-Zellisolation (*purity*) vorgenommen, um mögliche Einflüsse rechnerisch weitestgehend auszuschließen. Weiterhin wurde über ein Random-Intercept für die Intrapatientenkorrelation kontrolliert (Term: 1|PatientenId).

Das gemischte lineare Modell wird exemplarisch beschrieben durch:

$$y \sim \beta_1 \cdot \text{Alter} + \beta_2 \cdot \text{Geschlecht} + \beta_3 \cdot \text{Purity} + \alpha_1 + \alpha_2 + \alpha_3 + \alpha_4 \\ + (1 | \text{PatientenID})$$

Hierbei beschreibt y das gemessene *Outcome*, im Falle dieser Studie die gemessenen IL-10 Spiegel oder Antikörpertiter. Die Effekte von ausgewählten Variablen, wie CpG, NECA, Coffein und Diagnose (Referenzkategorie HC), werden durch die Koeffizienten α_1 , α_2 und α_3 und α_4 repräsentiert.

Die weiteren Statistiken wurden mit SPSS 24 gerechnet. Zum Vergleich der Gruppen sowie des Einflusses der Stimuli Coffein und NECA wurde eine MANOVA gerechnet. Als Post-Hoc-Test wurde die Bonferroni-Korrektur verwendet. Ein Signifikanzniveau von $\leq 5\%$ wurde festgelegt, zu diesem Niveau signifikante Unterschiede wurden in Abbildungen entsprechend gekennzeichnet. Graphen wurden mittels Sigmaplot 12.5 sowie SPSS 24 gezeichnet. Liniendiagramme sind mit Fehlerbalken (*whiskers*) dargestellt, die jeweils eine Standardabweichung abbilden.

Für die Beschreibung der Assoziation der klinischen Parameter wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient r (zu einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$) gewählt. Da die Richtung der Auswirkung vorher nicht bekannt war, wurden zweiseitige Wahrscheinlichkeiten getestet. Die Berechnung wurde mittels SPSS 24 durchgeführt. Das Ausmaß der Korrelation wurde anhand der Richtlinien von Cohen (1988) beschrieben. Hierbei gilt: geringe Korrelation $|r| \leq 0,1$, moderate Korrelation $|r| \leq 0,3$, starke Korrelation $|r| \leq 0,5$.

3.8 Erklärung der Autorin

Ich habe an allen oben beschriebenen Schritten mitgewirkt bzw. diese selbst durchgeführt. Bei den Tätigkeiten habe ich, insbesondere in der Einarbeitungsphase, jedoch auch Hilfestellungen bezogen, die ich an dieser Stelle anführen und mich bei allen Helfenden herzlich bedanken möchte.

Planung der Studie: Prof. Dr. med. Georg Pongratz, Dr. med. Magdalena Siekierka-Harreis, Prof. Dr. Matthias Schneider

Blutentnahme der Patienten: approbierte Ärzte der Poliklinik für Rheumatologie

Zellkultur: Birgit Opgenoorth, Dr. med. Magdalena Siekierka-Harreis, Prof. Dr. med. Georg Pongratz, Ellen Bleck

Statistische Auswertung: Dr. Ralph Brinks, Prof. Dr. Georg Pongratz, Dr. med. Magdalena Siekierka-Harreis

4 Ergebnisse

4.1 Klinische Informationen

Die Patientengruppe bestand aus 31 SLE-Patienten (n= 28 Frauen (87,1 %) und n=3 Männer (12,9 %)). Das Durchschnittsalter lag bei $45,42 \pm 14,61$ Jahren (Mittelwert \pm Standardabweichung). Alle Patienten hatten die Diagnose des SLE nach den Kriterien des ACR (1). Keiner der Patienten war nach Einschätzung des behandelnden Rheumatologen klinisch aktiv. Dies spiegelt sich auch im *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* (SLEDAI) wieder, der für 15 Patienten vorlag und im Mittel bei $1,53 \pm 2,23$ Punkten (≤ 4 , was einer Definition als inaktiver Erkrankung entspricht) lag. Die mittlere Erkrankungsdauer betrug $15,55 \pm 9,2$ Jahre. Der durchschnittliche tägliche, anamnestisch erfragte Kaffeeconsum betrug $2,85 \pm 1,88$ Tassen à 250 ml pro Tag; der Coffein-Talspiegel, gemessen zum Zeitpunkt der Blutentnahme betrug $3,59 \pm 2,64$ mg/l. Weitere klinische Parameter sind Tabelle 4-1 zu entnehmen.

Parameter (Einheit) (Referenzbereich)	Mittelwert	Standardabweichung
Alter SLE-Patienten (Jahre)	45,42	14,61
Alter HC (Jahre)	38,80	14,05
SLEDAI (Punkte) (< 4)	1,53	2,23
SLAQ (Punkte)	6,96	5,87
CRP (mg/dl) (< 0,5)	0,21	0,19
Hämoglobin (g/dl) (12-16)	13,19	1,21
C3 (mg/dl) (90-180)	91,88	14,67
C4 (mg/dl) (10-40)	15,70	6,34
anti-dsDNA-AK (IU/ml) (< 80)	146,16	169,58
Erkrankungsdauer (Jahre)	15,55	9,20
BMI (kg/m ²)	24,65	3,97
Kaffeeconsum (Tassen à 250 ml/Tag)	2,85	1,88
Coffeinspiegel (mg/l) (8- 15)	3,59	2,64
Kreatinin (mg/dl) (< 0,9)	0,90	0,26
GFR (ml/min) (90- 140)	87,25	24,27
IgG (mg/dl) (700- 1600)	1192,03	252,65
Ig A (mg/dl) (70- 500)	224,36	103,21
IgM (mg/dl) (40- 230)	116,51	171,35
Leukozyten (x1000/ μ l) (4- 11)	5,32	1,90
Lymphozyten (%) (25- 40)	22,67	11,66
Erythrozyturie (Anzahl/ μ l)	15,06	10,54
Leukozyturie (Anzahl/ μ l) (< 20)	23,17	33,32
Proteinurie (mg/l) (< 150)	137,51	207,29
Ferritin (μ g/l) (13- 150)	92,11	75,83

Tabelle 4-1: Klinische Parameter der Patientengruppe, Normbereiche in Klammern. SLEDAI: *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*, SLAQ: *Systemic Lupus Activity Index*, CRP: C-reaktives-Protein, BMI: *Body Mass Index*, GFR: Glomeruläre Filtrationsrate.

Die Patienten standen unter Medikation mit Prednisolon (12/31), Mycophenolat mofetil (1/31), Azathioprin (2/31), Hydroxychloroquin (22/31), Cyclosporin A (1/31), Methotrexat (1/31) oder waren ohne Medikation (5/31). Details zur Medikation sind in Tabelle 4-2 aufgelistet.

Es wurden Proben von 15 gesunden Probanden untersucht (n= 5 Frauen (33,3 %), n= 10 Männer (66,7 %)). Das Durchschnittsalter der Kontrollgruppe betrug $38,8 \pm 14,05$ Jahre (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Patienten- Nummer	PRE	MMF	AZA	HCQ	CSA	MTX	Diagnose- stellung (Jahr)	Erkrankungsdauer (Jahre)
1	5,0	0	0	0	0	0	1990	26
2	0	0	0	200	0	0	1988	28
3	0	0	0	200	0	0	2000	16
4	2,0	0	0	0	0	0	2000	16
5	2,5	0	0	400	0	0	1991	25
6	7,0	0	0	400	0	0	2007	9
7	5,0	0	0	300	0	7,5	2010	6
8	7,5	0	0	400	0	0	2015	1
9	0	0	0	200	0	0	2013	3
10	0	0	0	0	0	0	1975	41
11	0	0	0	0	0	0	1979	37
12	0	0	0	400	0	0	2005	11
13	5,0	0	0	0	0	0	2002	14
14	8,0	0	0	250	0	0	1992	24
15	0	0	0	0	0	0	2006	10
16	0	0	0	400	0	0	2005	11
17	5,0	0	100	400	0	0	2008	8
18	0	0	0	200	0	0	1995	21
19	0	0	0	300	0	0	1999	17
20	0	0	0	0	0	0	2001	15
21	2,5	0	0	200	0	0	2000	16
22	5,0	0	0	400	0	0	2009	7
23	0	0	0	300	100	0	1998	18
24	0	0	0	400	0	20,0	2002	14
25	0	0	0	400	0	0	2012	4
26	0	1000	0	0	0	0	2007	9
27	2,5	0	0	200	0	0	1996	20
28	0	0	50	200	0	0	2003	13
29	0	0	0	300	0	0	2007	9
30	0	0	0	0	0	0	2002	14
31	0	0	0	300	0	0	1997	19

Tabelle 4-2: Medikation der Patienten mit Dosis in Klammern. PRE: Prednisolon in mg/Tag, MMF: Mycophenolat Mofetil in mg/Tag, AZA: Azathioprin in mg/Tag, HCQ: Hydroxychloroquin in mg/Tag, CSA: Cyclosporin A in mg/Tag, MTX: Methotrexat in mg/Woche.

Die Reinheit der B-Zell-Kultur, gemessen mittels CD19- Positivität, betrug im Mittel 70,32 %. Es fiel in der Analyse mit FlowJo eine Verunreinigung einiger Proben ($n_{\text{gesamt}}= 11$, $n_{\text{HC}}= 3$, $n_{\text{SLE}}= 8$) mit Zellen auf, die im FSC/SSC *Gate* morphologisch Makrophagen ähneln. Für die Auswertung der FACS-Daten ist dies nicht weiter relevant, da wir diese Nicht-B-Zellen durch entsprechende Gate-Setzung aus der Analyse herausnehmen konnten.

4.1.1 Analyse der B-Zell-Subpopulationen

Am Tag der Blutentnahme wurden die B-Zellen von SLE und HC im FACS auf ihre Subpopulationen hin untersucht. Das Prinzip und exakte Vorgehen ist ausführlich in Kapitel 2.4, 3.5 und 3.7.1 beschrieben.

4.1.1.1 Anmerkungen zur Definition der Subpopulationen

Anhand der ausgewählten Oberflächenmarker wurde in dieser Studie eine Einteilung der B-Zellen in acht verschiedene Subpopulationen vorgenommen (s. Tabelle 4-3).

Subpopulation	CD27	IgD	CD138	CD38	CD21
<i>exhausted memory</i>	-	-	-		-
<i>transitional</i>	-	+		high	low/-
<i>naive mature</i>	-	+	-	-	+
<i>switched memory</i>	+	-			
<i>non-switched memory</i>	+	+			
<i>resting memory</i>	+	-		-	+
<i>plasmablast</i>	+	-		high	+/-
<i>plasmacell</i>			+	high	

Tabelle 4-3: Definition der B-Zell-Subpopulationen anhand ihrer Oberflächenmarker. CD: Cluster of Differentiation, IgD: Oberflächen-Immunglobulin D. *Exhausted Memory*: erschöpfte Gedächtniszelle, *Transitional*: Transitionale Zelle, *Naive Mature*: reife, nicht aktivierte B-Zelle, *Plasmablast*: Plasmablast, *Resting Memory*: ruhende Gedächtniszelle, *Switched Memory*: Gedächtniszelle mit Ig-Klassenwechsel, *Non-Switched Memory*: Gedächtniszelle, die noch keinen Ig-Klassenwechsel im Keimzentrum durchlaufen hat, *Plasmacell*: Plasmazelle.

Es gibt verschiedene Einteilungen der B-Zell-Subpopulationen beim Menschen (31,58). An einem einheitlichen und somit vergleichbaren Definitionsprotokoll wird derzeit international gearbeitet. Da es zum Zeitpunkt der Datenerhebung dieser Studie jedoch noch kein einheitliches Protokoll gab, folgen anschließend einige Anmerkungen zu in dieser Studie verwendeten Definitionen.

Transitionale Zellen (*transitionals*) sind frühe B-Zell-Vorläufer, die aus dem Knochenmark in das periphere Blut abgegeben werden. Sie sind CD27⁻, CD38^{high}, CD24^{high} (55). Da wir CD24 nicht in unser Panel aufgenommen hatten, fügten wir stattdessen eine positive IgD-Expression zu unserer Definition hinzu, welche unreife Zellen vor Kontakt mit dem GC inkludiert (78). Verschiedene Reifestufen der Transitionalen werden mit unterschiedlich hoher Expression von CD21 beschrieben, wobei sie im Verlauf ihrer Entwicklung zunehmend CD21 exprimieren (79,80). Wir verzichteten auf eine weitere Unterteilung der Transitionalen, und zählen sowohl Zellen dazu, die CD21 auf niedrigem Niveau exprimieren als auch solche, die es noch nicht exprimieren.

Naive reife B-Zellen (*naive mature*) können neben der Expression von CD19 mit den Markern CD27, CD38 (81), IgD und CD21 (82–85) umschrieben werden. Häufig wird diese Population nur grob mit zwei dieser Marker definiert, z.B. IgD⁺ und CD27⁻ oder CD27⁻ und CD21⁺ (78,86), woraus sich ein sehr hoher Anteil von etwa zwei Dritteln der naiven B-Zellen an den Gesamt-B-Zellen ergibt. Unsere Klassifizierung der reifen naiven Zellen ist deutlich enger gefasst, um ein Überschneiden z.B. mit den Transitionalen zu vermeiden. Weiterhin gibt es uneinheitliche Angaben über die CD38-Expression dieser Zellen. So umschreiben manche Gruppen die Naiven als CD38⁺ (85,87), während Andere sie als CD38⁻ beschreiben (82,84) und wieder Andere CD38^{low/-} dazuzählen (81). Auf ihrem Reifungsweg verlieren die Transitionalen CD38, bis sie es gänzlich verlieren. Unsere Definition einer *mature naive* Zelle bezieht sich folglich auf sehr späte reife Zellen, die durch das Blutgefäßsystem zirkulieren.

Gedächtniszellen unterschieden wir in vier Untergruppen. Die erschöpften Gedächtniszellen (*exhausted memory*, häufig auch als *double negative* beschrieben) kann man anhand der

fehlenden Expression von CD27, IgD und CD21 klassifizieren (85,88). Unter *in-vitro* Stimulation sind sie im Vergleich zu reifen B-Zellen hypoproliferativ, wobei ihre Kapazität zur Antikörperproduktion jedoch erhalten bleibt (89).

B-Zellen exprimieren CD27, nachdem sie Antigenkontakt in den Keimzentren der Lymphknoten hatten. In der GCR unterlaufen die Zellen dabei häufig eine somatische Hypermutation und Ig-Klassenwechsel (*class switch recombination CSR*). Dann kann man sie in *switched memory* (SM; CD27+, IgD-) oder *non-switched memory* (NSM; CD27+, IgD+) unterscheiden. Aus den SM entstehen bei erneutem Antigenkontakt Plasmazellen, die mit Hilfe von IgG, IgA oder IgM Antikörpern für eine schnelle Entfernung des Antigens sorgen. Sie unterscheiden sich von NSM insofern, als dass NSM lediglich Antikörper des Typs IgM produzieren (85) und im Falle eines erneuten Kontakts mit dem Antigen erneut die GCR durchlaufen können, um für einen Nachschub der SM zu sorgen (90).

Ruhende Gedächtniszellen (*resting memory*) sind eine weitere Untergruppe der Gedächtniszellen. Sie können einen Klassenwechsel durchlaufen haben und sind dann CD27+ und IgD-; ferner exprimieren sie CD21, das sie bei Aktivierung aus ihrem Ruhestatus wieder verlieren (85). CD38 haben solche B-Zellen seit dem Transitional-Stadium verloren, und sie exprimieren es erst wieder als Plasmablasten (91).

Plasmablasten sind die Vorstufen der antikörperproduzierenden Plasmazellen. Sie werden durch CD27^{high}, CD38^{high} und intrazelluläres Ig charakterisiert (92,93). Sie exprimieren kein IgD mehr (94). Wir unterschieden CD27+, IgD-, CD38^{high} Plasmablasten in eine CD21 exprimierende und nicht-exprimierende Fraktion. Plasmazellen exprimieren das für sie spezifische CD138 und sind CD38^{high}.

4.1.1.2 Expression einzelner Marker

Wir stellten Evidenz für eine erhöhte Expression von CD38 bei SLE-Patienten fest. Statistische Trends zeichneten sich bei der Expression von CD138 und CD21 ab, wobei die SLE-Patienten einen erhöhten Anteil CD138+ und einen erniedrigten Anteil CD21+ Zellen aufwiesen (s. Abbildung 4-1). Die Expression der übrigen Marker CD27, CD73 und IgD unterschied sich nicht zwischen HC und SLE. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test sind Tabelle 4-4 zu entnehmen.

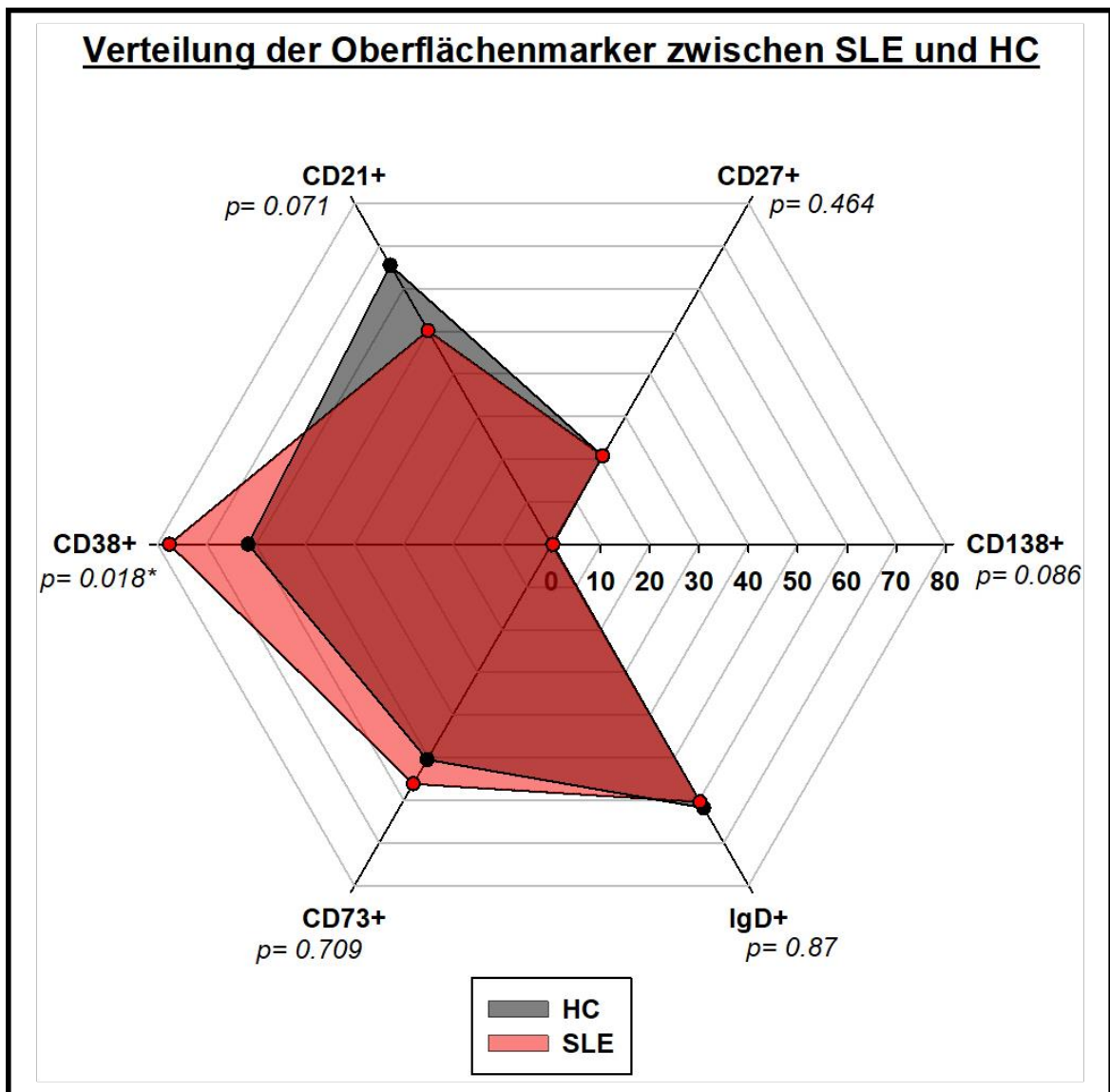


Abbildung 4-1: Darstellung der Verteilung der Subpopulationen (Mediane) im *Spiderchart*-Format. Skala in Prozent der Gesamt-B-Zell-Zahl. Unterschiede zwischen den Gruppen sind dort zu suchen, wo sich die Flächen nicht überschneiden. Vergleich der beiden Gruppen mittels des Mann-Whitney-U-Tests. Statistisch signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$) sind markiert (*). SLE: Systemischer Lupus Erythematoses, HC: *Healthy Control*.

Marker	HC			SLE			U	Z	p
	Mdn	MW	SD	Mdn	MW	SD			
CD21+	65,50	59,47	5,66	50,15	51,41	3,14	112,0	-1,807	0,071
CD27+	20,75	24,21	3,50	20,8	20,56	2,38	148,0	-0,732	0,464
CD38+	61,6	64,26	3,77	77,6	73,9	2,82	93,0	-2,374	0,018*
CD73+	50,5	48,00	4,52	56,15	52,50	3,52	160,0	-0,373	0,709
CD138+	0,24	0,42	0,16	0,29	0,56	0,13	115,0	-1,718	0,086
IgD+	61,8	55,69	5,89	60,4	57,67	3,152	167,0	-0,164	0,870

Tabelle 4-4: Mann-Whitney-U-Test für einzelne Marker. Angegeben sind Median (Mdn) in Prozent, Mittelwert (MW) in Prozent und Standardabweichung (SD) in Prozent für jede Diagnosegruppe (SLE= Systemischer Lupus Erythematoses mit $n = 23$, HC= Kontrollgruppe mit $n = 15$), U-Wert und Z-Wert. Als statistisch signifikant wurden p -Werte $< 0,05$ gewertet und selbige markiert (*). Mdn: Median in %, MW: Mittelwert in %, SD: Standardabweichung in %, U: U-Wert, Z: Z-Wert, p: p-Wert.

4.1.1.3 Subpopulationen

Bei einem Vergleich der Gruppen stellten wir starke Evidenz für einen erhöhten Anteil an *transitionals*, *plasmacells* und *plasmablasts* bei SLE-Patienten fest. Die Plasmablasten

ließen sich anhand ihrer CD21-Expression in zwei Untergruppen teilen, die beide bei SLE erhöht waren. Die SLE-Patienten unserer Studie wiesen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen einen verringerten Anteil *mature naive* B-Zellen auf. Weiterhin ergab sich ein statistischer Trend für einen verringerten Anteil *resting memory* bei den SLE-Patienten (s. Abbildung 4-2). Es gab keine Evidenz für einen Unterschied der Gruppen bei den anderen Subpopulationen (*exhausted memory*, *switched memory*, *nonswitched memory*). Die Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests sind Tabelle 4-5 zu entnehmen.

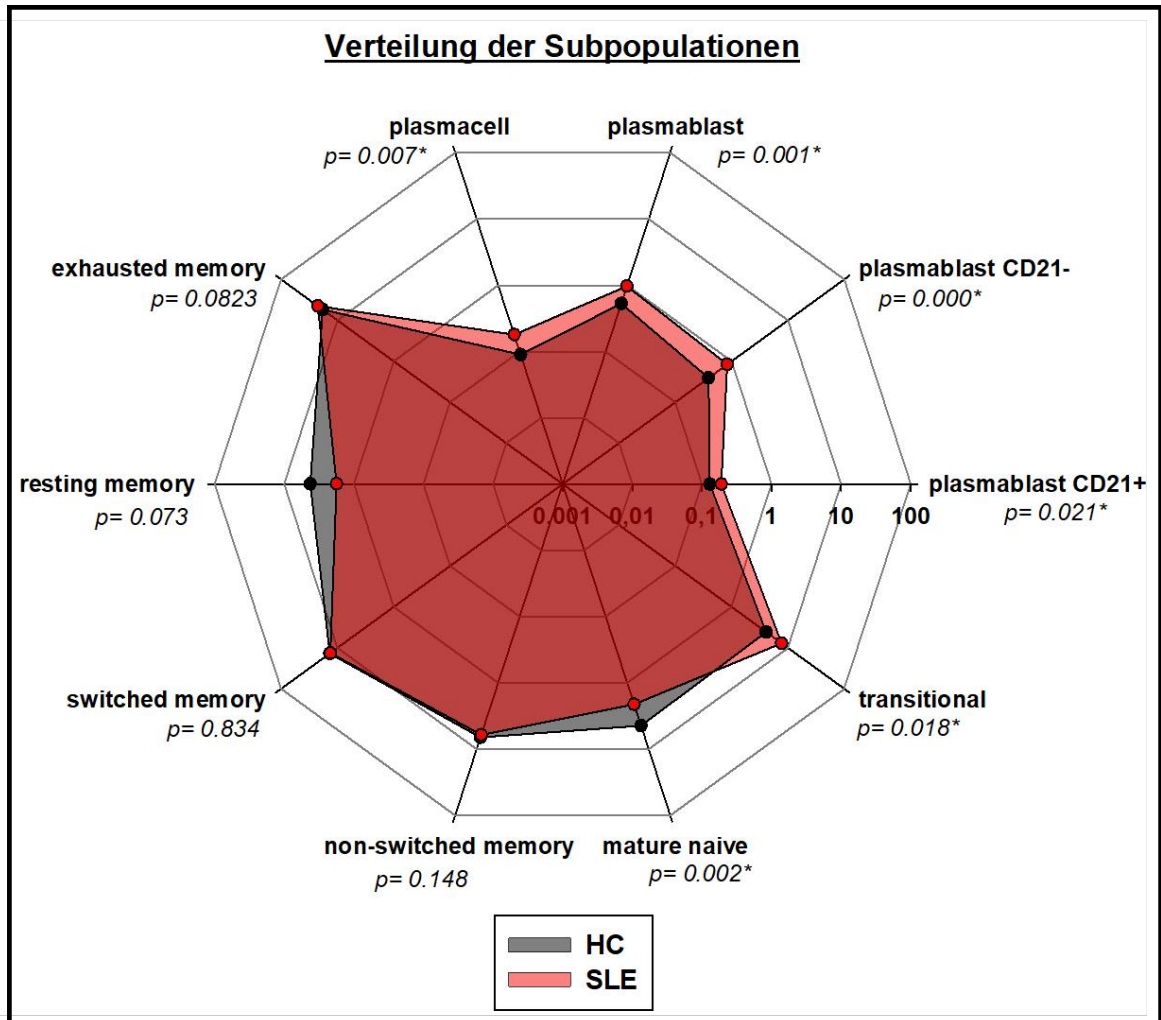


Abbildung 4-2: Darstellung der Verteilung der Subpopulationen (Mediane). Logarithmische Skala in Prozent der Gesamt-B-Zell-Zahl. Vergleich beider Gruppen mittels des Mann-Whitney-U-Tests. Unterschiede sind dort zu suchen, wo sich die Flächen nicht überschneiden. Statistisch signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$) sind markiert (*).

Subpopulation	HC			SLE			U	Z	p
	Mdn	MW	SD	Mdn	MW	SD			
<i>exhausted memory</i>	18,3	27,06	5,84	22,3	25,38	3,75	165,0	-0,224	0,823
<i>transitional</i>	4,12	5,98	1,97	7,73	8,75	1,26	93,0	-2,374	0,018*
<i>mature naive</i>	4,43	7,42	2,15	2,11	2,52	0,43	70,0	-3,061	0,002*
<i>plasmablast</i>	0,53	0,54	0,08	0,97	2,19	0,75	64,0	-3,241	0,001*
<i>plasmablast CD21+</i>	0,13	0,15	0,03	0,19	0,76	0,34	95,5	-2,302	0,021*
<i>plasmablast CD21-</i>	0,39	0,40	0,06	0,84	1,45	0,41	6,0	-3,481	0,000*
<i>resting memory</i>	4,23	3,97	0,62	1,77	2,41	0,40	112,5	-1,792	0,073
<i>switched memory</i>	13,7	14,36	1,67	13,35	14,31	1,68	165,5	-0,209	0,834
<i>non-switched memory</i>	6,64	10,32	2,24	6,08	6,47	1,03	124,0	-1,448	0,148
<i>plasmacell</i>	0,09	0,11	0,02	0,18	0,41	0,12	82,0	-2,704	0,007*

Tabelle 4-5: Mann-Whitney-U-Test für die vorher definierten Subpopulationen. Angegeben sind Median (Mdn), Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) in Prozent für jede Diagnosegruppe (SLE= Systemischer Lupus Erythematodes mit n= 23, HC= Kontrollgruppe mit n= 15), U-Wert und Z-Wert. Als statistisch signifikant wurden p-Werte < 0,05 gewertet und selbige markiert (*). Mdn: Median in %, MW: Mittelwert in %, SD: Standardabweichung in %, U: U-Wert, Z: Z-Wert, p: p-Wert.

4.1.1.4 CD73-Expression der Subpopulationen

CD73 ist in Kombination mit CD39 an der Synthese von extrazellulärem Adenosin beteiligt. Den regulatorischen B-Zellen wird unter anderem über die Expression dieser Enzyme ihre regulatorische Einwirkung auf B-Zell-T-Zell-Interaktion zugeschrieben. Aus diesem Grund wollten wir die Expression von CD73 bei den jeweiligen Subpopulationen untersuchen.

Wir stellten eine vermehrte Expression von CD73 bei *exhausted memory* bei SLE-Patienten fest (p= 0,004). Bei den Plasmablasten sowie deren CD21+ Anteil wiesen die SLE-B-Zellen eine verminderte Expression von CD73 auf (p= 0,04 und p= 0,017, s. Abbildung 4-3). Die übrigen Subpopulationen unterschieden sich zwischen gesunden Kontrollen und SLE-Patienten hinsichtlich ihrer Expression von CD73 nicht (s. Tabelle 4-6).

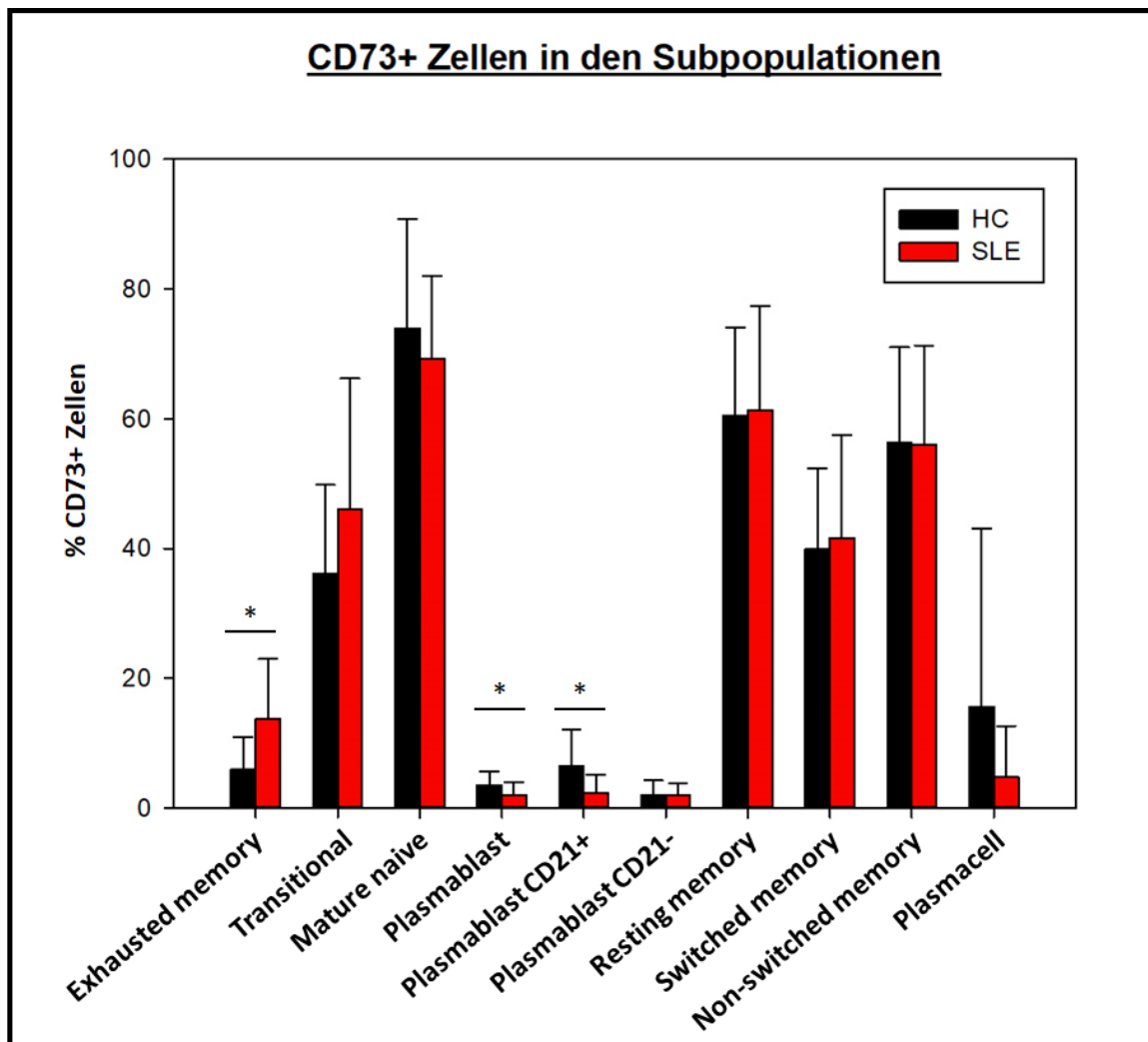


Abbildung 4-3: Darstellung des prozentualen Anteils CD73 positiver Zellen (Mittelwerte \pm Standardabweichung) innerhalb der Subpopulationen. Vergleich der beiden Gruppen mittels Mann-Whitney-U-Tests. P-Werte $< 0,05$ sind mit * markiert.

CD73+ in den Subpopulationen	HC			SLE			U	Z	p
	Mdn	MW	SD	Mdn	MW	SD			
<i>exhausted memory</i>	3,83	5,94	5,03	11,45	13,72	9,23	77	-2,852	0,004*
<i>transitional</i>	38,01	36,08	13,71	43,75	46,06	20,17	132	-1,210	0,235
<i>mature naive</i>	75,50	73,89	16,91	71,65	69,26	12,82	120	-1,392	0,164
<i>plasmablast</i>	2,90	3,50	2,18	1,47	2,06	1,88	79	-2,050	0,04*
<i>plasmablast CD21+</i>	6,01	6,53	5,55	1,47	2,33	2,79	66	-2,382	0,017*
<i>plasmablast CD21-</i>	1,26	2,01	2,27	1,80	2,00	1,80	122	-0,556	0,595
<i>resting memory</i>	65,10	60,54	13,47	65,15	61,38	15,96	172	-0,015	0,988
<i>switched memory</i>	40,00	39,92	12,43	39,80	41,65	15,88	170	-0,075	0,953
<i>non-switched memory</i>	63,10	56,34	14,66	56,70	56,10	15,24	170	-0,075	0,953
<i>plasmacell</i>	6,67	15,60	27,49	2,30	4,79	7,88	126	-0,780	0,454

Tabelle 4-6: Anteil der CD73+ Zellen bei den Subpopulationen von SLE und HC (Mann-Whitney-U-Test). Angegeben sind Median (Mdn) in Prozent, Mittelwert (MW) in Prozent und Standardabweichung (SD) in Prozent für jede Diagnosegruppe (SLE= Systemischer Lupus Erythematodes mit n= 22, HC= Kontrollgruppe mit n= 12), U-Wert und Z-Wert. Als statistisch signifikant wurden p-Werte $< 0,05$ gewertet und selbige markiert (*). Mdn: Median in %, MW: Mittelwert in %, SD: Standardabweichung in %, U: U-Wert, Z: Z-Wert, p: p-Wert.

4.1.2 Ergebnisse der Stimulation in der Zellkultur

4.1.2.1 Erster Überblick: Gruppenvergleiche SLE – HC mit SMD-Werten

Für einen ersten Überblick über die umfangreichen Daten werden die gemessenen Parameter (dsDNA IgG, dsDNA IgM, IgG, IgM, IL-10, *early apopt*, *late apopt*, *living*) bei den zwei Gruppen SLE und HC mittels t-Test miteinander verglichen. Als Effektmaß wird die SMD (*Standardized Mean Difference*) berichtet. Für Erläuterungen zur SMD, s. Kapitel 3.7.2 oder *The Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* (77).

Zusammenfassend stellten wir fest, dass SLE bei IL-10 und fast allen Antikörpern, mit Ausnahme der IgM, bei unterschiedlichen Stimuli erhöhte Titer produzieren als HC. Bei den Apoptosewerten zeigte sich ein deutlich vermindertes Überleben der SLE B-Zellen bei allen Stimuli. Abbildung 4-4 gibt einen Überblick über den direkten Vergleich beider Gruppen. Die Ergebnisse werden anschließend näher erläutert.

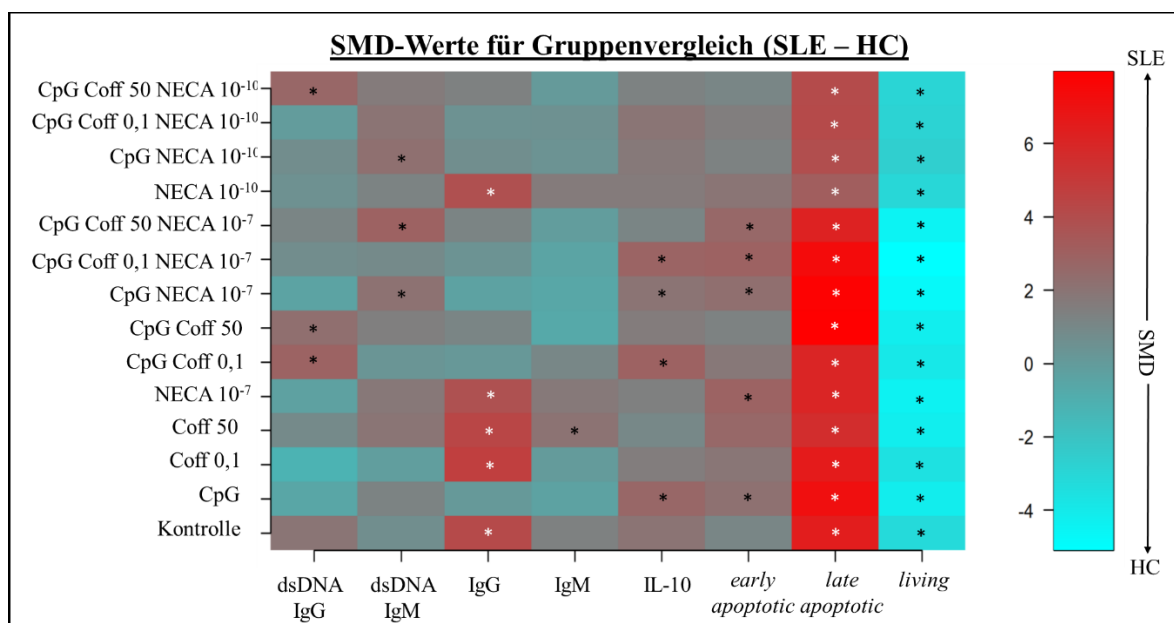


Abbildung 4-4: Matrix mit SMD-Werten für die Outcomes (horizontale Achse) unter verschiedenen Stimuli (vertikale Achse). Rote Farbumschläge indizieren einen positiven SMD mit höheren SMD bei SLE, blaue Farbumschläge indizieren einen negativen SMD mit niedrigeren SMD bei HC. Statistisch zu einem p-Wert <0,05 signifikante Ergebnisse sind markiert (*). Coff: Coffein (Konzentrationen in mg/ml), NECA: Adenosinrezeptoragonist (Konzentration in mmol/l).

Bei dsDNA IgG lagen signifikante Unterschiede unter CpG in Kombination mit Coffein und NECA vor; diese sind in Abbildung 4-4 mit * markiert. Unter diesen Stimuli produzieren SLE mehr dsDNA IgG als HC in einem Umfang von etwa 2 bis 3 Standardabweichungen ($SMD_{CpG\ Coff0,1} = 2,88$ und $p = 0,006$, $SMD_{CpG\ Coff50} = 2,27$ und $p = 0,02$, $SMD_{CpG\ Coff50\ NECA-10} = 2,66$ und $p = 0,01$).

Auch bei dsDNA IgM produzieren SLE-Patienten im Vergleich zu HC zwischen 1,5 bis 3 Standardabweichungen mehr Antikörper ($SMD_{CpG\ NECA-7} = 2,13$ und $p = 0,03$, $SMD_{CpG\ Coff\ 50\ NECA-7} = 2,93$ und $p = 0,005$, $SMD_{CpG\ NECA-10} = 2,22$ und $p = 0,03$).

Bei der IgG-Produktion sind um 3 bis 4 erhöhte Standardabweichungen bei SLE festzustellen, allerdings nur bei Stimuli ohne CpG ($SMD_{Kontrolle} = 4,13$ und $p = 0,0002$,

SMD_{Coff0,1}= 4,7 und p< 0,0001, SMD_{Coff50}= 4,38 und p= 0,0001, SMD_{NECA-7}= 3,7 und p= 0,0006, SMD_{NECA-10}= 3,82 und p= 0,001).

Bezüglich der IgM-Produktion gibt es nur einen Wert, bei dem in unserer Population die SLE mehr IgM produzieren als HC (SMD_{Coff50}= 2,09 und p= 0,04).

Auch die IL-10-Produktion ist unter einigen Bedingungen bei SLE um 2 bis 3 Standardabweichungen höher als bei HC (SMD_{CpG}= 2,69 und p= 0,01, SMD_{CpG Coff0,1}= 2,93 und p= 0,005, SMD_{CpG NECA-7}= 2,04 und p= 0,04, SMD_{CpG Coff0,1 NECA-7}= 2,85 und p= 0,007).

Bei allen getesteten Stimuli zeigten sich mehr apoptotische Zellen bei SLE im Vergleich zu HC, wohingegen bei HC in allen Gruppen mehr lebende Zellen gemessen wurden. Zur Vereinfachung der Interpretation werden im Folgenden alle apoptotischen Zellen (*early* und *late*) inhaltlich zusammengefasst. Alle SMD- und zugehörigen p-Werte können Tabelle 4-7 und Tabelle 4-8 entnommen werden.

SMD-Werte für Gruppenvergleich (SLE – HC)											
Stimuli	Parameter	dsDNA					early				late
		IgG	IgM	IgG	IgM	IL-10	apoptotic	apoptotic	living		
Kontrolle		1.95621579	0.7120818	4.1326356	1.37314175	1.997802	1.121090	6.433228	-3.145853		
CpG		-0.49729321	1.2409066	0.1504972	-0.31950390	2.693866	2.187073	7.135035	-4.132350		
Coff 0,1		-1.16307917	-0.1268236	4.7034938	0.04205018	1.589342	1.915086	6.544823	-3.497418		
Coff 50		0.89185950	1.9576824	4.3832758	2.09130391	1.024828	2.617375	5.606779	-4.160922		
NECA 10 ⁻⁷		-0.24732017	1.7987954	3.7866870	1.75937514	1.389302	2.879499	6.054189	-4.386031		
CpG Coff 0,1		2.88083469	0.3694081	0.2147189	1.05775440	2.939759	1.830844	6.017327	-3.861268		
CpG Coff 50		2.27456235	1.4736527	1.1730575	-0.67290881	1.635193	1.295877	7.939833	-4.188629		
CpG NECA 10 ⁻⁷		-0.37313192	2.1366367	-0.3158799	-0.58381857	2.044017	2.253157	7.816055	-4.720665		
CpG Coff 0,1 NECA 10 ⁻⁷		0.75230085	0.8862234	0.4438599	-0.40118094	2.854624	2.946325	7.333423	-5.065246		
CpG Coff 50 NECA 10 ⁻⁷		1.14436651	2.9347560	1.2245638	-0.07756543	1.173877	2.607248	6.172777	-4.444337		
NECA 10 ⁻¹⁰		0.56114770	1.2484381	3.8270987	1.65669678	1.690480	1.980171	3.119010	-3.012727		
CpG NECA 10 ⁻¹⁰		0.76021983	2.2284473	0.7193300	0.42615928	1.767449	1.286740	3.969365	-2.578154		
CpG Coff 0,1 NECA 10 ⁻¹⁰		0.01452021	2.0403897	0.5140830	0.56672524	1.974539	1.532103	4.146047	-2.813831		
CpG Coff 50 NECA 10 ⁻¹⁰		2.66033272	1.6422939	1.3377887	0.08801356	1.296254	1.125071	4.091522	-2.912617		

Tabelle 4-7: SMD-Werte korrespondierend zu den Farbunterschieden in Abbildung 4-4. Positive Vorzeichen bedeuten erhöhte Mittelwerte bei SLE, negative Vorzeichen erhöhte SMD bei HC.

p-Werte für SMD für Gruppenvergleich (SLE – HC)										
Stimuli	Parameter	dsDNA		IgG			early		late	
		IgG	IgM	IgG	IgM	IL-10	apoptotic	apoptotic	living	
Kontrolle		0.05967	0.48032	0.00023	0.17811	0.05519	0.27578	0.00000	0.00501	
CpG		0.62279	0.22238	0.88193	0.75158	0.01048	0.04036	0.00000	0.00039	
Coff 0,1		0.25740	0.89999	0.00004	0.96689	0.12282	0.07022	0.00000	0.00217	
Coff 50		0.37788	0.05954	0.00011	0.04254	0.31392	0.01732	0.00000	0.00055	
NECA 10 ⁻⁷		0.80698	0.08008	0.00060	0.08567	0.17532	0.00944	0.00000	0.00029	
CpG Coff 0,1		0.00616	0.71466	0.83244	0.29632	0.00561	0.08140	0.00000	0.00077	
CpG Coff 50		0.02818	0.14883	0.25300	0.50793	0.10933	0.20781	0.00000	0.00033	
CpG NECA 10 ⁻⁷		0.71205	0.03883	0.75539	0.56502	0.04939	0.03314	0.00000	0.00005	
CpG Coff 0,1 NECA 10 ⁻⁷		0.45816	0.38189	0.66255	0.69167	0.00769	0.00729	0.00000	0.00003	
CpG Coff 50 NECA 10 ⁻⁷		0.26203	0.00564	0.23489	0.93874	0.24691	0.01617	0.00000	0.00017	
NECA 10 ⁻¹⁰		0.57930	0.22296	0.00124	0.10938	0.10919	0.05857	0.00401	0.00607	
CpG NECA 10 ⁻¹⁰		0.45290	0.03658	0.47885	0.67294	0.08973	0.21193	0.00052	0.01570	
CpG Coff 0,1 NECA 10 ⁻¹⁰		0.98852	0.05271	0.61245	0.57502	0.06153	0.13762	0.00031	0.00872	
CpG Coff 50 NECA 10 ⁻¹⁰		0.01450	0.11093	0.19286	0.93057	0.20822	0.26993	0.00042	0.00692	

Tabelle 4-8: p-Werte zu den SMD-Werten aus Tabelle 4-7. Evidenz wurde ab einem p-Wert < 0,05 angenommen.

4.1.2.2 MANOVA

Zusammenfassend konnte bisher gezeigt werden, dass die SLE insgesamt bei der Antikörper- und Zytokinproduktion höhere Titer aufweisen als HC, sowie ein deutlich schlechteres Überleben haben. Diese Zusammenhänge bestätigen sich in der MANOVA. Weiterhin

wurde der Einfluss von Coffein und NECA auf die Antikörperproduktion in der MANOVA genauer untersucht.

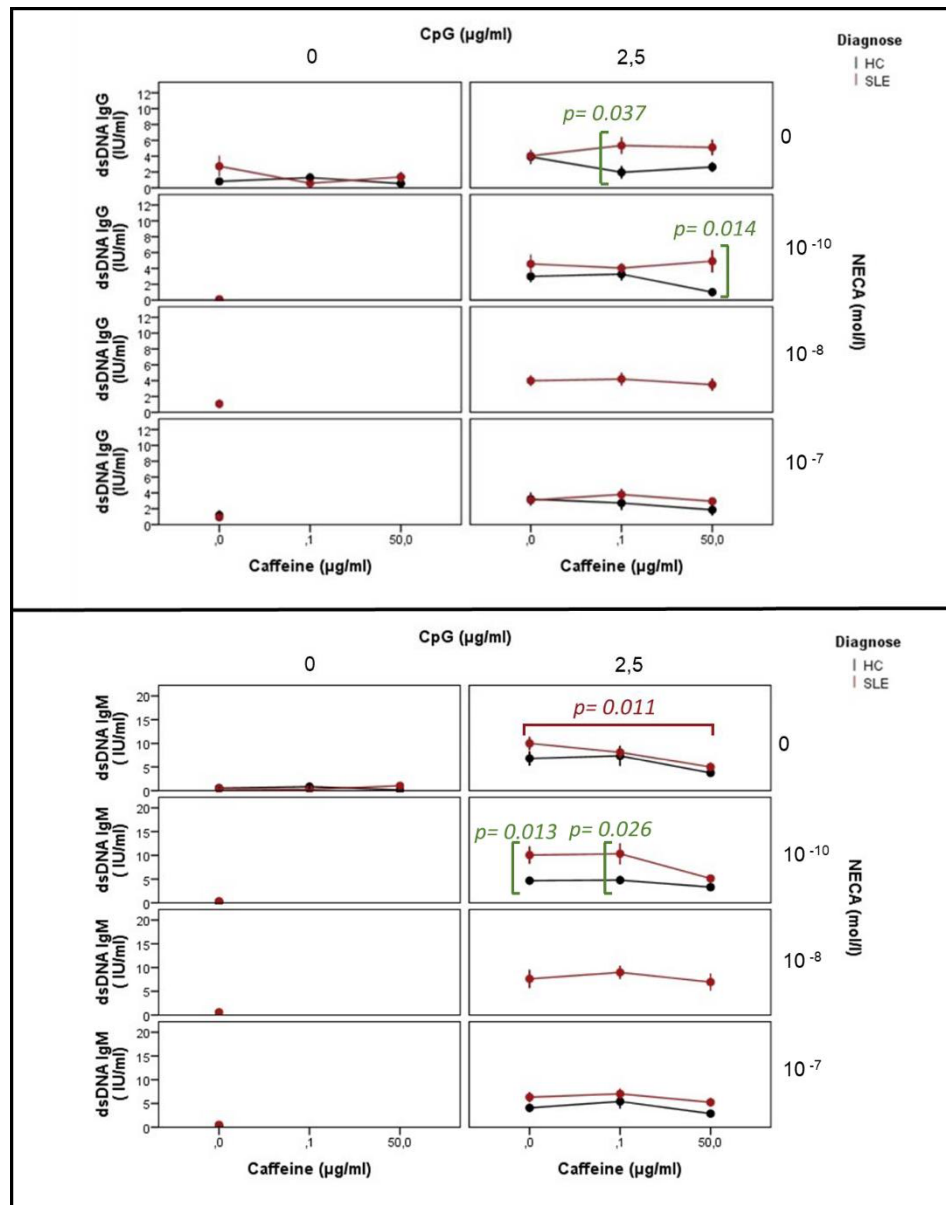


Abbildung 4-5: Liniendiagramme zu den *Outcomes* dsDNA IgG und dsDNA IgM im Vergleich der Gruppen SLE und HC. Outcome (dsDNA IgG und dsDNA IgM) auf der y-Achse, Coffein-Dosis auf der x-Achse (Caffeine). Spalten unterteilen die Daten nach Vorhandensein von CpG (0 oder 2,5 µg/ml) und Zeilen nach Vorhandensein von NECA (0 oder 10⁻¹⁰ oder 10⁻⁸ oder 10⁻⁷ mol/l). Statistisch signifikante Unterschiede sind mit Klammern hervorgehoben.

Bezüglich der dsDNA IgG Antikörperproduktion gibt es in der MANOVA keine Evidenz für einen Einfluss von Coffein oder NECA. Bei zwei Stimuli gibt es Evidenz für höhere Titer bei den SLE ($p_{\text{CpG Coffein low}} = 0,037$ und $p_{\text{CpG Coffein high NECA low}} = 0,014$). Bei den übrigen Stimuli sind deskriptiv ebenfalls höhere Titer zu vermerken, diese sind aber nicht signifikant. Es fällt auf, dass der Nachweis der dsDNA IgG insgesamt an der unteren Detektionsgrenze des ELISA liegt (Abbildung 4-5).

Die dsDNA IgM Antikörper waren besser messbar; auch hier liegen die Titer bei SLE höher ($p_{\text{CpG NECA low}} = 0,013$ und $p_{\text{CpG Coffein low NECA low}} = 0,026$). Hier zeigt sich ein hemmender

Einfluss von hohen Dosen Coffein bei den SLE unter der Stimulation mit CpG ($p=0,011$, Abbildung 4-5).

Bei den IgG Antikörpern lassen sich höhere Titer bei den SLE feststellen, solange kein CpG unter den Stimuli ist. Es gibt keine Evidenz für einen Einfluss von Coffein oder NECA (Abbildung 4-6). Die IgM Titer unterscheiden sich zwischen den Gruppen nicht.

Unter Stimulation von CpG weisen SLE höhere IL-10 Spiegel auf als HC, auch unter Hinzugabe von Coffein_{low} und NECA_{low} (Abbildung 4-6). Ein Einfluss von Coffein oder NECA kann hier zu einem Signifikanzniveau von 5% nicht nachgewiesen werden. Es zeichnet sich bei den SLE jedoch ein statistischer Trend ab, dass es unter CpG und NECA_{medium} einen Unterschied zwischen Coffein_{low} im Vergleich zu Coffein_{high} gibt ($p=0,061$). Dies zeichnet sich auch unter CpG und NECA_{high} ab ($p=0,087$, Daten im Graphen nicht eingezeichnet). Im statistischen Trend hemmt Coffein also die IL-10-Produktion bei den SLE B-Zellen.

Bei den Apoptosedaten zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen SLE und HC über nahezu alle Stimulantienkombinationen hinweg. Insgesamt haben SLE-BZellen ein deutlich schlechteres Überleben als HC-B-Zellen. Alle zu einem Signifikanzniveau von 5 % relevanten p-Werte sind in Abbildung 4-7 dargestellt.

Zusammenfassend zeigt sich ein Einfluss von Coffein oder NECA in der MANOVA lediglich bei den dsDNA IgM Antikörpern. Bei den übrigen *Outcomes* zeigte sich keine Evidenz für einen Einfluss. Anhand der deskriptiven Darstellung der Daten lässt sich jedoch zeigen, dass die Datenpunkte generell einen parallelen Verlauf zu haben scheinen, und keinen gegenläufigen. Lediglich bei den Werten für die IL-10-Titer deutet sich im statistischen Trend eine Zunahme unter Coffein_{low} und eine Abnahme der Titer unter Coffein_{high} an (Abbildung 4-6, Liniendiagramme unten rechts). Da die Datenpunkte einen linearen Verlauf nehmen, bot es sich an die Dosis-Wirkungs-Beziehung in einem linearen Modell zu untersuchen, welches unter 4.1.2.3 erläutert wird.

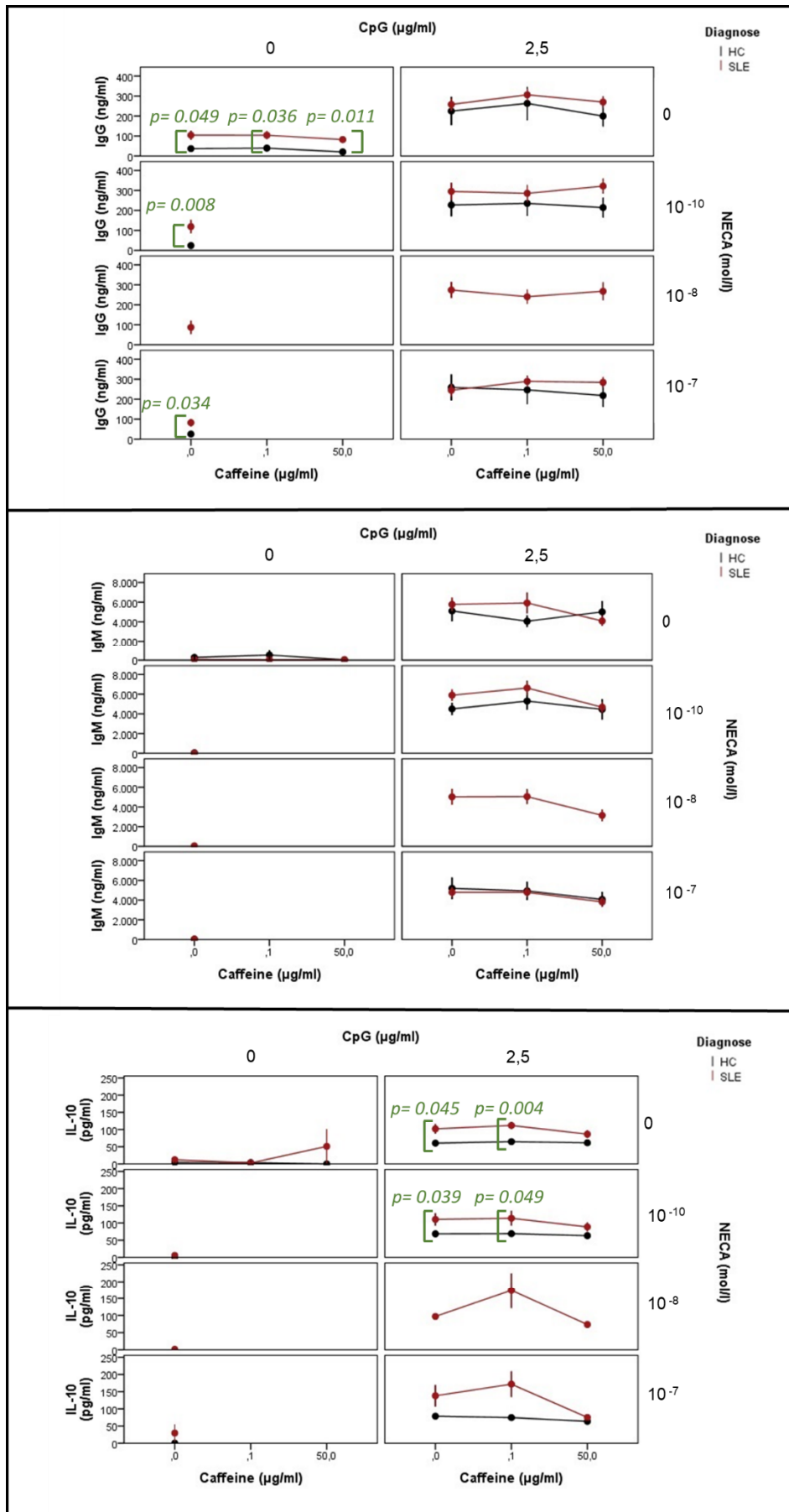


Abbildung 4-6: Liniendiagramme zu den Outcomes IgG, IgM und IL-10 im Vergleich der Gruppen SLE und HC. Outcome (IgG, IgM und IL-10) auf der y-Achse, übrige Unterteilung wie in Abbildung 4-5.

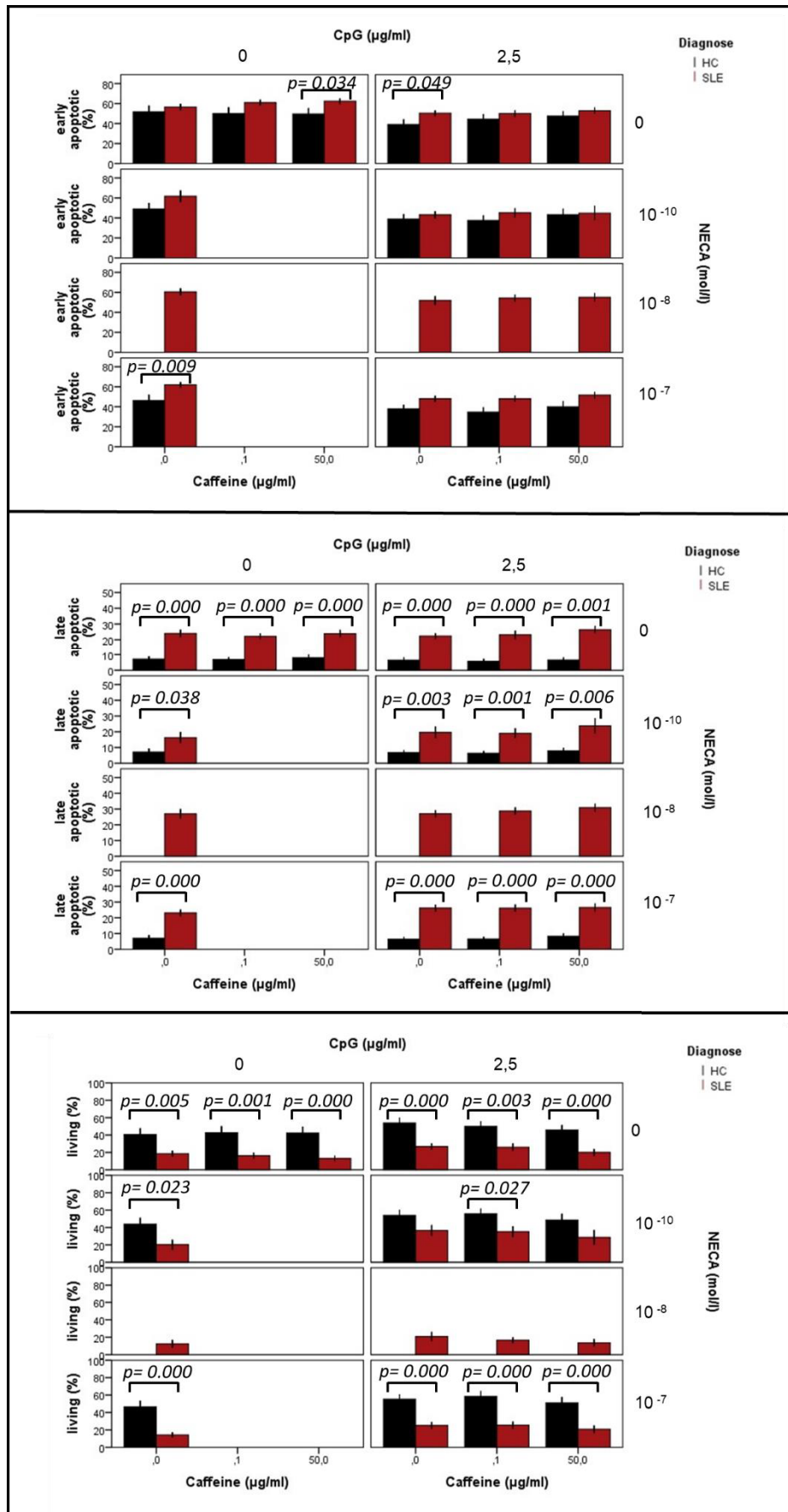


Abbildung 4-7: Balkendiagramme zu den Outcomes *early apoptotic*, *late apoptotic* und *living* im Vergleich der Gruppen SLE und HC. Outcome (*early apoptotic*, *late apoptotic*, *living*) auf der y-Achse, übrige Unterteilung wie in Abbildung 4-5. Statistisch signifikante Unterschiede mittels MANOVA sind mit Klammern hervorgehoben.

4.1.2.3 Regressionsanalyse mittels gemischtem Regressionsmodell

Um den Einfluss der Stimuli CpG, Coffein und NECA genauer zu untersuchen, wird ein linear gemischtes Regressionsmodell herangezogen. Die Regressionskoeffizienten mit p-Werten sind in Tabelle 4-9 dargestellt. Auf die Analyse von Interaktionseffekten wurde aufgrund der niedrigen Fallzahl verzichtet.

Outcome	CpG		Coffein		NECA	
	SLE	HC	SLE	HC	SLE	HC
dsDNA IgG	1,27 p< 0,0001	0,99 p< 0,0001	-0,00 p= 0,741	-0,02 p< 0,0001	0,16 p= 0,0007	0,07 p= 0,018
dsDNA IgM	3,13 p< 0,0001	2,23 p< 0,001	-0,04 p= 0,0002	-0,04 p< 0,0001	0,08 p= 0,146	0,18 p< 0,0004
IgG	62,92 p< 0,0001	86,96 p< 0,0001	0,13 p= 0,413	-0,51 p= 0,091	-0,53 p= 0,523	0,87 p= 0,59
IgM	1900,16 p< 0,0001	1914,15 p< 0,0001	-13,19 p< 0,0006	-11,27 p= 0,027	24,48 p= 0,244	27,14 p= 0,316
IL-10	39,64 p< 0,0001	27,43 p< 0,99	-0,61 p< 0,0001	-0,14 p< 0,0005	0,63 p= 0,357	-0,05 p= 0,782
early apoptotic	-4,81 p< 0,0001	-2,79 p< 0,0001	0,06 p= 0,01	0,05 p= 0,016	0,05 p= 0,69	0,24 p= 0,038
late apoptotic	0,55 p= 0,0335	-0,25 p= 0,113	0,06 p< 0,0001	0,02 p= 0,0089	-0,02 p= 0,812	-0,06 p= 0,172
living	4,29 p< 0,0001	3,05 p< 0,0001	-0,13 p< 0,0001	-0,07 p< 0,0009	-0,01 p= 0,975	-0,18 p= 0,12

Tabelle 4-9: Alters-, geschlechts- und *purity*-adjustierte Regressionskoeffizienten mit dazugehörigen p-Werten. Der Einfluss von CpG, Coffein und NECA (Spalten) auf die Outcomes dsDNA IgG, dsDNA IgM, IgG, IgM, IL-10, *early apoptotic*, *late apoptotic*, *living* (Zeilen) wird nach der Gruppe SLE und HC getrennt untersucht. Zellen mit statistisch signifikanten Werten sind gelb hinterlegt.

Es zeigt sich, dass die Gruppe SLE erhöhte dsDNA IgM Titer hat, im statistischen Trend auch bei IL-10. Es bestätigt sich auch hier, dass die Gruppenzugehörigkeit zu SLE mit erhöhten Apoptose- und erniedrigten *living* Werten einhergeht.

CpG, ein unspezifischer TLR-Stimulus, zeigt bei den *Outcomes* erwartungsgemäß eine deutliche Steigerung der Antikörperantwort, und wirkt sich gleichzeitig positiv auf die Überlebensrate aus.

Die Regressionsanalyse zeigt, dass Coffein die Antikörperantwort tendenziell hemmt. Dieser Effekt zeigt sich nicht nur bei den dsDNA IgM Antikörpern (wie bereits in der MANOVA), sondern ebenfalls bei den IgM, IL-10 und im Trend auch bei den dsDNA IgG Antikörpern. Coffein verschlechtert aber das Überleben der B-Zellen.

Bei NECA als physiologischem Gegenspieler zu Coffein lässt sich eine leicht steigernde Wirkung auf dsDNA IgG und dsDNA IgM Antikörper nachweisen.

4.1.2.4 Assoziation mittels Pearson-Korrelationskoeffizient

Es erfolgte die Korrelation ausgewählter erfasster klinischer Parameter untereinander sowie mit ausgewählten Zellkulturdaten. Es wurden die durchschnittlich konsumierte Menge Coffein, ausgedrückt in Tassen Kaffee à 250 ml pro Tag, erfragt (Kaffeekonsum) und mit dem am Untersuchungstag bestimmten Serumspiegel des Coffeins (Coffeinspiegel) verglichen. Hierbei zeigte sich eine moderate positive Korrelation (Pearsons $r=0,46$, $p=0,01$), was für eine gute interne Validität der Daten bezüglich der Patientenangaben zum

Kaffeeconsum spricht. Es gab keinerlei Korrelation mit dem SLEDAI, jedoch eine positive Korrelation von SLAQ mit dem Coffeinserumspiegel (Tabelle 4-10). Weiterhin korrelierten wir den Kaffeeconsum sowie den Coffeinspiegel mit den Zellkulturdaten ohne Zusatz weiterer Stimulantien (Leerproduktion der Zellen/Kontrolle, Tabelle 4-10).

Parameter	Kaffeeconsum (Tassen pro Tag)	Coffeinserumspiegel
Coffeinserumspiegel	r= 0,47 p= 0,01*	r= 1
SLEDAI	r= -0,07 p= 0,79	r= -0,25 p= 0,38
SLAQ	r= -0,25 p= 0,21	r= 0,48 p= 0,02*
dsDNA (Serum)	r= -0,15 p= 0,43	r= 0,05 p= 0,77
dsDNA IgG	r= 0,11 p= 0,57	r= 0,42 p= 0,03*
dsDNA IgM	r= 0,42 p= 0,02*	r= 0,27 p= 0,16
IgG	r= -0,26 p= 0,17	r= -0,10 p= 0,63
IgM	r= -0,60 p= 0,75	r= -0,10 p= 0,62
IL-10	r= -0,39 p= 0,03*	r= -0,46 p= 0,01*
Early apop	r= -0,10 p= 0,60	r= 0,14 p= 0,47
Late Apop	r= -0,39 p= 0,03*	r= -0,20 p= 0,30
Living	r= 0,32 p= 0,08	r= 0,02 p= 0,93

Tabelle 4-10: Pearson's Korrelationskoeffizienten (r) zum Signifikanzniveau $p= 0,05$. Die Parameter dsDNA IgG, dsDNA IgM, IgG, IgM, IL-10, Early apop, Late apop sowie Living bezeichnen die Spontanproduktion in der Zellkultur ohne Stimulation. Signifikante Werte sind mit einem (*) gekennzeichnet sowie gelb hinterlegt.

Es gab eine moderate positive Korrelation des Coffeinserumspiegels mit den dsDNA IgG der Zellkultur. Bei den dsDNA IgM besteht eine moderate positive Korrelation mit dem durchschnittlichen Kaffeeconsum. Eine moderate negative Korrelation des IL-10 besteht sowohl beim Kaffeeconsum als auch beim Coffeinserumspiegel. Die Apoptose (*late apoptotic*) zeigte eine negative Korrelation mit dem Kaffeeconsum; im Gegensatz dazu wurde die gleiche Korrelation bei den *living* nur im statistischen Trend ($p= 0,08$) erreicht.

5 Diskussion

5.1 Verschiebung der B-Zell-Kompartimente bei SLE-Patienten in Remission

5.1.1 Erhöhter Anteil transitionaler und aktivierter Zellen beim SLE

Bei SLE-Patienten ist eine veränderte Verteilung der B-Zell-Subpopulationen beschrieben. Aktive Erkrankung ist mit einem erhöhten Anteil an Plasmablasten und Plasmazellen assoziiert (92,93,95). Auch der Anteil Transitionaler Zellen sowie *exhausted memory* und *switched memory* ist bei SLE-Patienten tendenziell erhöht, während der Anteil an *mature naive* und *non switched memory* reduziert ist (85,92,93,96–99).

Eine Defizienz von CD21 bei Lupuspatienten ist schon mehrfach beschrieben worden (67,100,101). In unserer Population zeigten SLE-B-Zellen eine CD21-Defizienz lediglich als statistischen Trend (CD21+ Median SLE: 50,15% und HC 65,5 bei $p=0,07$). Dies ist möglicherweise durch die geringe Fallzahl bedingt. Eine mögliche Ursache für die CD21 Defizienz könnte die Ausdifferenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen sein, die in unserer Studie erhöht waren (Median HC 0,09, SLE 0,18, $p=0,007$).

Ein Merkmal unserer Studie ist, dass wir Patienten in Krankheitsremission untersucht haben. Unsere Daten zeigen, dass bestimmte Veränderungen der Subpopulationen trotz Remission persistieren. Der Anteil der Transitionalen, Plasmablasten und Plasmazellen ist erhöht, während der Anteil an reifen naiven (*mature naive*) B-Zellen erniedrigt ist. Diese Verschiebungen sind bei SLE Patienten mit aktiver Erkrankung bekannt (97,98). Ein erhöhter Anteil an Plasmablasten und Plasmazellen korreliert mit der Krankheitsaktivität (102). Die *exhausted memory* sind in unseren Daten nicht erhöht. Gründe hierfür könnten die Inaktivität der Erkrankung (gemessen am SLEDAI <4) sein (103). Da sich dafür jedoch ein statistischer Trend abzeichnet ($p=0,082$) kann die geringe Fallzahl ebenfalls ein Grund dafür sein.

5.1.2 Leichte Unterschiede in der CD73 Expression bei SLE und HC

Zusätzlich zur Quantifizierung der einzelnen B-Zell-Subpopulationen untersuchten wir diese auf ihre Expression von CD73. CD73 sowie CD39 sind Ektonukleotidasen, die gemeinsam extrazelluläres ATP zu AMP bzw. Adenosin dephosphorylieren können. Da Coffein als Adenosinrezeptorantagonist fungiert, steht es auf diesem Wege in direktem Gegensatz zu von der Zelle bereitgestelltem Adenosin.

Insbesondere einem bislang nur unzureichend definierten Subset der B-Zellen, den regulatorischen B-Zellen oder B_{regs} , wird ein immuninhibierender Einfluss über die Genese von extrazellulärem Adenosin und dessen Wirkung über B-Zell-T-Zell-Interaktionen zugeschrieben. Diese Zellen zeichnen sich durch Sekretion von IL-10 und TGF- β aus, und können Proliferation und Funktion von T_{effs} und T_{regs} hemmen (57,75). Insbesondere B_{regs} , die viel CD39^{high} auf ihrer Oberfläche exprimieren, wird diese Funktion zugeschrieben (42). Da ein Großteil der B-Zellen CD73 exprimiert (41), und somit diesen Zellen eine Immunregulierung über Adenosin prinzipiell möglich ist, war es von Interesse, die Expression von CD73 auf den jeweiligen B-Zell-Subsets zu untersuchen. Unsere Ergebnisse

geben den Hinweis, dass CD73 bei *exhausted memory* und Plasmablasten bei SLE und HC unterschiedlich verteilt ist.

Im Mausmodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis konnte den Plasmablasten eine immunmodulierende Funktion durch IL-10-Produktion im Sinne einer B_{reg} Funktion zugeschrieben werden (104). Weiterhin postulierten Figueiró et al., dass der Haupteffekt von B_{regs} stamme, die CD39^{high} exprimieren (42). Dies könnte eine autokrine und parakrine regulatorische Funktion von B_{regs} im Allgemeinen über den Adenosinweg bedeuten. Die in unserer Studie festgestellte verminderte Expression von CD73 der Plasmablasten könnte somit einen Hinweis auf eine verminderte immunregulatorische Kapazität solcher Zellen bei Patienten mit SLE geben. Eine sichere Antwort auf diese Frage können wir mit unseren Daten nicht geben. B_{regs} beim Menschen sind bis heute noch nicht abschließend definiert. Rosser et al. ziehen in einem *Review* die Möglichkeit in Betracht, dass B_{regs} aus jeder peripheren B-Zelle, abhängig von Umweltsignalen, entstehen können, um eine überschießende Immunreaktion zu vermeiden (43). Unsere Daten lassen somit zumindest die Hypothese zu, dass B_{regs} beim SLE aufgrund der verminderten CD39 Expression dysfunktional sind und weniger regulatorische Kapazität haben als bei gesunden Kontrollen.

CD27- IgD- *exhausted memory (double negative)* B-Zellen sind relativ gut bei HIV-Patienten beschrieben (105–107); Zellen mit ähnlichen Eigenschaften kommen jedoch auch bei Erkrankungen mit chronischer Inflammation, wie HCV-Infektion (89), Rheumatoider Arthritis und auch SLE (85,108) in erhöhtem Anteil vor. Diese Zellen zeichnen sich durch niedrige Proliferationskapazität aus und haben keine Effektorfunktionen im Sinne einer AK-Produktion mehr, können aber proinflammatorische Zytokine produzieren (88). Auf Basis unserer Daten können wir zeigen, dass sich diese Zellpopulation bei SLE von Gesunden insofern unterscheidet, als dass sie etwas mehr CD73 exprimieren als HC.

Welche funktionelle Rolle des CD73 sich hieraus ergibt, wird in dieser Studie nicht untersucht. Die Funktion des CD73 wird außerdem durch die Enzymaktivität mitbestimmt, welche wir im Rahmen dieser Studie nicht gemessen haben. Zukünftige Studien sollten diesen Teilaspekt mit untersuchen.

5.2 Apoptose ist bei SLE trotz Remission erhöht, Coffein hat ambivalente Wirkungen

Um den Adenosinstoffwechsel weiter zu charakterisieren, wurde in der vorliegenden Studie der Effekt von Coffein und NECA in Kombination mit CpG auf die Antikörperantwort von B-Zellen sowie deren Überlebensrate untersucht. Wie eingangs erwähnt, vermutet man beim SLE, dass verschiedene Faktoren zu einem Ausbruch der Krankheit führen können. In den Fokus rückt hier insbesondere eine fehlgeleitete Apoptose bzw. der Abbau von Zellresten apoptotischer Zellen. Überreste apoptotischer Zellen können autoreaktiven B-Zellen präsentiert werden und so zu einer Generierung von Autoantikörpern führen (109). Von Relevanz ist hier insbesondere der TLR9-Signalweg (18,19,110,111). In unserer Studie können wir zeigen, dass B-Zellen auch von SLE-Patienten in klinischer Remission ein deutlich reduziertes Überleben haben, verglichen mit gesunden Kontrollen. Bisherige Studien haben sich häufig mit klinisch aktiven Patienten beschäftigt (33,85,112). Daten zu Patienten in klinischer Remission gibt es wenige. Unsere Ergebnisse zeigen, dass *in vitro* die B-Zellen von SLE-Patienten auch in klinischer Remission ein geringeres Überleben haben als die von gesunden Kontrollprobanden. Dies stützt die Annahme, dass fehlgeleitete Apoptose kein Epiphänomen der Entzündung ist, sondern als ursächlicher Faktor bei der Krankheitsentstehung und -unterhaltung angenommen werden kann.

Die Präsenz von Autoantikörpern vom Typ IgM ist mit verringerter Krankheitsaktivität assoziiert. Weiterhin sind einige Autoantikörper wie z.B. dsDNA IgM AK auch im gesunden Organismus vorhanden (5,113). Im Mausmodell des SLE ist beschrieben, dass unter Behandlung mit dsDNA IgM AK eine Nierenbeteiligung schwächer und später eintritt (114,115). Ähnliche Ergebnisse konnten auch am Menschen reproduziert werden (8). Ein Erklärungsansatz ist, dass dsDNA IgM Autoantikörper durch Bindung freier dsDNA eine Bildung pathologischer IgG-dsDNA Immunkomplexe verhindern oder reduzieren könnten. In unserer Regressionsanalyse zeigte sich, dass B-Zellen von SLE Patienten in Remission höhere Titer von dsDNA IgM *in vitro* produzieren als B-Zellen von HC, was mit zur Remissionserhaltung beitragen könnte.

B-Zellen von SLE-Patienten zeigten spontan eine höhere Produktion von IgG Antikörpern als B-Zellen von gesunden Kontrollen. Sobald mit CpG stimuliert wurde, stiegen die Titer beider Gruppen an, und der Unterschied zwischen den Gruppen verschwand (Abbildung 4-6). Auch Zorro et al. hatten ähnliche Ergebnisse festgestellt, dort jedoch noch ergänzt, dass Patienten mit starker Krankheitsaktivität sogar weniger auf die Stimulation reagieren als Patienten mit moderater Aktivität (110). Eine mögliche Erklärung für unser Ergebnis ist, dass B-Zellen von SLE Patienten im Vergleich zu Gesunden voraktiviert sind und schon im Ruhezustand mehr IgG produzieren, wohl auch bei Patienten in Remission. Unter Hinzugabe von CpG kann auch bei Gesunden eine Steigerung der globalen IgG Produktion auf das Niveau von SLE B-Zellen erreicht werden.

IL-10 ist ein Zytokin, das von vielen Immunzellen im Körper produziert wird. In Bezug auf B-Zellen wird die Produktion vor allem B_{regs} zugeschrieben (116). Im Gegensatz zu vielen anderen Autoimmunerkrankungen geht der SLE mit einer erhöhten IL-10-Produktion einher. Erhöhte Serumlevel korrelieren positiv mit der Krankheitsaktivität und werden teils als pathognomonisch für die Erkrankung gesehen (26,28,117,118). Weiterhin erhöht IL-10 die

Produktion von Autoantikörpern beim SLE und ist ein starker B-Zell-Stimulus (28,119). Es gibt jedoch auch Studien, die eine antiinflammatorische Wirkung von IL-10 bei SLE zeigen (29). Insgesamt wird die Wirkung von IL-10 in Bezug auf den SLE als eher proinflammatorisch beschrieben, insbesondere aufgrund der fördernden Eigenschaften auf die Autoantikörperproduktion sowie die B-Zell-Aktivierung und –differenzierung.

In unserer Studie zeichnen sich die B-Zellen der SLE Patienten in der Zellkultur durch eine erhöhte IL-10 Produktion bei einigen Stimuli aus (s. Abbildung 4-4), trotz klinischer Remission, was in Konkordanz mit den klinischen Angaben aus der Literatur steht.

Unsere Studie untersuchte weiterhin die Effekte von Coffein auf die Immunantwort beim SLE. Es gibt Hinweise darauf, dass Coffein antiinflammatorische Eigenschaften besitzt (120,121). In dieser Studie wirkte Coffein bei HC und SLE auf alle untersuchten Antikörper und Zytokine hemmend (s. Daten in Tabelle 4-9). Hierbei zeigte die Regressionsanalyse *in vitro* einen hemmenden Einfluss von Coffein auf dsDNA IgM, IgM und IL-10 sowohl bei SLE als auch bei HC. Ferner zeigte sich eine Hemmung der dsDNA IgG AK bei den HC.

Unsere Ergebnisse zeigen einerseits einen inhibierenden Effekt des Coffeins auf die Antikörperproduktion. Insbesondere die Hemmung der IL-10 Produktion könnte über die oben diskutierten Wirkungen von IL-10 zur antiinflammatorischen Wirkung des Coffeins beitragen. Andererseits verschlechtert Coffein aber das Überleben (122,123) der B-Zellen *in vitro* (s. Abbildung 1-1). Über die bereits beschriebenen Mechanismen der Zunahme von Apoptose und Zelldebris könnte dies zur Exazerbation der Krankheit beitragen (18–20,111), falls dies auch *in vivo* so stattfinden würde. Coffein könnte somit ein Stresssignal für die Zellen sein, auf welches sie mit vermindertem Überleben und geringerer Aktivität reagieren.

Wir führten einige ausgewählte Assoziationen mittels Pearson- Korrelation durch (Tabelle 4-10). Von Interesse waren hier insbesondere der von den Patienten angegebene durchschnittliche tägliche Kaffeekonsum sowie der an dem Tag gemessene Serumspiegel des Coffeins. Hierbei gab es eine positive Assoziation, welche darauf hinweist, dass sich anhand der Angabe des langfristigen Konsums der tatsächliche aktuelle Coffeinspiegel im Serum gut abschätzen lässt. Interessant hierbei ist, dass die Spontanproduktion von IL-10 in der Zellkultur sowohl mit dem Coffeintalpiegel im Serum als auch mit der regelmäßig konsumierten Kaffeemenge invers assoziiert ist (s. Tabelle 4-10). Das spiegelt die *in vitro* gemessene drosselnde Wirkung von Coffein auf IL-10 auch *in vivo* wieder.

Wir korrelierten weiterhin die Coffeinangaben mit den klinischen Parametern SLEDAI, SLAQ sowie dem Serum dsDNA Titer. Hierbei zeigte sich keine Assoziation, jedoch ging ein hoher SLAQ mit erhöhtem Coffeinserumspiegel einher. Bei der Apoptose zeigte sich eine moderate inverse Assoziation mit dem regelmäßigen Kaffeekonsum. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu unseren Ergebnissen aus der Zellkultur. Es gibt jedoch Hinweise auf eine unterschiedliche Wirkung von Coffein abhängig davon, ob es als Einzeldosis wirkt oder wiederholte Dosen appliziert werden (47,124,125). Weiterhin stellt die Übertragbarkeit von *in vitro* erhobenen Zellkultur-Daten auf den lebenden Organismus *in vivo* grundsätzlich eine methodische Einschränkung dar. In unserer Studie haben wir ein Maß sowohl für Kurzzeit- sowie Langzeitexposition von Coffein: der Expositionsspiegel zum Zeitpunkt der B-Zell-Isolation wurde durch den im

Serum gemessenen Coffeinspiegel gemessen, während die Angabe des Patienten zum regelmäßigen Kaffeekonsum einen Hinweis auf die Langzeitexposition gibt. Möglicherweise ist der Grund für die negative Assoziation der Apoptose mit dem regelmäßigen Kaffeekonsum in der gegensätzlichen Wirkung von Coffein abhängig von der Expositionsdauer zu suchen. Kürzlich postulierten Orefice et al. in einer 2020 publizierten Analyse (126), dass ein erhöhter Coffeinkonsum (gemessen anhand eines Fragebogens) mit niedrigerer Krankheitsaktivität (gemessen am SLEDAI 2K) sowie niedrigeren Zytokinleveln im Serum einhergehe. Weiterhin hatten in dieser Kohorte Patienten mit Organbeteiligung (Niere oder ZNS) einen eher reduzierten Kaffeekonsum. Diese klinischen Hinweise unterstützen die Hypothese, dass Coffein abhängig von der Expositionsdauer unterschiedliche Wirkungen auf das Krankheitsbild des SLE haben kann und klinisch sich langfristig eher positiv auf die Krankheitsaktivität auswirkt.

Tabelle 5-1 gibt eine Übersicht über die in dieser Studie festgestellten Wirkungen von Coffein.





Wirkung von Coffein	
Apoptose	
IL-10 Produktion	
dsDNA IgM Produktion	
IgM Produktion	

Tabelle 5-1: Zusammenfassung der in der Studie festgestellten Wirkungen von Coffein *in vitro* (Zellkultur) sowie bezüglich des IL-10 *in vivo* (Assoziationen der Leerproduktion in der Zellkultur zu Coffeinserumtalspiegel und täglicher Kaffeekonsum) in der durchgeführten Zellkulturanalyse.

Die abschließende Wirkung von Coffein auf die Krankheitsaktivität beim SLE verbleibt zu erurieren. Die in unserer Studie *in vitro* nachgewiesene erhöhte coffeininduzierte Apoptose könnte die Krankheit weiter fördern, während die Hemmung der Antikörperproduktion durch Coffein im Gegensatz hierzu steht. Insbesondere eine Hemmung auch des IL-10 in der Zellkultur betont die antiinflammatorische Wirkung des Coffeins im Rahmen des SLE. Die wenigen Hinweise, die es aus anderen Studien gibt, scheinen darauf hinzuweisen, dass ein hoher Coffeinkonsum langfristig mit einer niedrigen Krankheitsaktivität einhergeht (126).

6 Schlussfolgerungen

Eine generelle Herausforderung bei der Entzündungsforschung ist die Unterscheidung zwischen Epiphänomenen der Entzündung und Ursachen der Entzündung. Unsere Studie charakterisiert das B-Zell Kompartiment von SLE Patienten in Remission im Vergleich zu gesunden Kontrollen mit Fokus auf den Adenosinstoffwechsel und die Wirkung von Coffein in diesem Kontext. Die Untersuchung von SLE Patienten in Remission bietet generell den Vorteil, den Anteil der Ergebnisse, die durch Epiphänomene der Entzündung bedingt sind, möglichst gering zu halten und somit einen tieferen Einblick in die dem SLE zugrundeliegende Pathophysiologie zu gewinnen.

In ersten charakterisierenden Untersuchungen konnten wir zeigen, dass B-Zellen von SLE Patienten in Remission weiterhin eine höhere Apoptoserate aufweisen als B-Zellen von gesunden Kontrollen. Die Unterhaltung der Krankheit durch die Präsentation von Autoantigenen aus vermehrter Apoptose über den TLR9 Signalweg ist also auch bei SLE Patienten in Remission möglich.

In der Regressionsanalyse zeigte sich, dass SLE Patienten in Remission spontan mehr dsDNA IgM produzieren als gesunde Kontrollen. Für Anti-dsDNA-Antikörper vom Typ IgM wird ein protektiver Effekt in Bezug auf das Auftreten einer Nierenbeteiligung beim SLE diskutiert. Inwiefern ein kausaler Zusammenhang zwischen der Remissionserhaltung und der Fähigkeit der dsDNA IgM Produktion besteht, muss in weiteren Studien untersucht werden.

Coffein zeigte einen hemmenden Effekt auf die Antikörperantwort; weiterhin vermindert es das Überleben der B-Zellen unabhängig davon, ob die B-Zellen aus SLE oder gesunden Probanden untersucht wurden. Eingangs wurde die Hypothese aufgestellt, dass Coffein sich durch seine immunsupprimierende Wirkung positiv auf die Krankheitsaktivität des SLE auswirkt. Ob der Effekt des Coffeins auf die globale Krankheitsaktivität eher positiv oder negativ ist, vermag diese Studie allein nicht zu beantworten. Durch die Hemmung der Antikörperantwort und IL-10 Sekretion mag ein antiinflammatorisches Milieu positive Auswirkungen haben; genauso denkbar ist hingegen, dass die durch das Coffein erhöhte Apoptoserate sowie die Minderung der potenziell antiinflammatorisch wirksamen dsDNA IgM und kontrovers auch IL-10 die Krankheit eher aktiviert. In den Korrelationen mit dem Tageskonsum an Coffein und den gemessenen Serumspiegeln zeigte sich, dass die langfristige Wirkung des Coffeins (durchschnittlicher Konsum pro Tag) auf die Apoptose unter Umständen sogar gegensätzlich zur kurzfristigen Wirkung in der Zellkultur ausfällt. Die wenigen Hinweise, die es aus anderen Studien bezüglich der Wirkung des Coffeins auf den SLE gibt, scheinen einen antiinflammatorischen Effekt zu bekräftigen (126).

Coffein ist ein weit verbreitetes Konsumgut. Zukünftige Studien, die sich gezielt mit dessen Effekten und Assoziationen zu Krankheitsaktivität *in vivo* beschäftigen, könnten weitere Einblicke gewähren. Sollte sich die Krankheitsmodulation des SLE durch Coffein in anderen Studien bestätigen, so wäre Patienten eine Möglichkeit gegeben, ihren Krankheitsverlauf durch entsprechendes Verhalten zu beeinflussen.

7 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* September 1997;40(9):1725.
2. Aringer M. EULAR/ACR classification criteria for SLE. *Semin Arthritis Rheum.* 1. Dezember 2019;49(3, Supplement):S14–7.
3. Ter Borg EJ, Horst G, Hummel EJ, Limburg PC, Kallenberg CGM. Measurement of increases in anti-double-stranded dna antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1. Mai 1990;33(5):634–43.
4. Pan N, Amigues I, Lyman S, Duculan R, Aziz F, Crow M, u. a. A surge in anti-dsDNA titer predicts a severe lupus flare within six months. *Lupus.* 1. März 2014;23(3):293–8.
5. Williams W, Isenberg D. A cross-sectional study of anti-DNA antibodies in the serum and IgG and IgM fraction of healthy individuals, patients with systemic lupus erythematosus and their relatives. *Lupus.* 1. Dezember 1996;5(6):576–86.
6. Mr E, Dr K, Mh G, L P, Th W, Jr K, u. a. Human IgG anti-DNA Antibodies Deposit in Kidneys and Induce Proteinuria in SCID Mice [Internet]. *Kidney international.* 1995 [zitiert 27. Mai 2020]. Verfügbar unter:
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7474655/?from_single_result=M.+R.+Ehrenstein%2C+D.+R.+Katz%2C+M.+H.+Griffiths+et+al.%2C+%E2%80%9CHuman+IgG+anti-DNA+antibodies+deposit+in+kidneys+and+induce+proteinuria+in+SCID+mice%2C+%E2%80%9D+Kidney+International%2C+vol.+48%2C+no.+3%2C+pp.+705%E2%80%93711%2C+1995.&expanded_search_query=M.+R.+Ehrenstein%2C+D.+R.+Katz%2C+M.+H.+Griffiths+et+al.%2C+%E2%80%9CHuman+IgG+anti-DNA+antibodies+deposit+in+kidneys+and+induce+proteinuria+in+SCID+mice%2C+%E2%80%9D+Kidney+International%2C+vol.+48%2C+no.+3%2C+pp.+705%E2%80%93711%2C+1995.
7. Jia Y, Zhao L, Wang C, Shang J, Miao Y, Dong Y, u. a. Anti-Double-Stranded DNA Isotypes and Anti-C1q Antibody Improve the Diagnostic Specificity of Systemic Lupus Erythematosus. *Dis Markers* [Internet]. 27. September 2018 [zitiert 27. Mai 2020];2018. Verfügbar unter:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6180986/>
8. Keiserman B, Ronchetti MR, Monticciolo OA, Keiserman MW, Staub HL. Concomitance of IgM and IgG anti-dsDNA Antibodies Does Not Appear to Associate to Active Lupus Nephritis. *Open Rheumatol J.* 15. November 2013;7:101–4.
9. Villalta D, Bizzaro N, Bassi N, Zen M, Gatto M, Ghirardello A, u. a. Anti-dsDNA Antibody Isotypes in Systemic Lupus Erythematosus: IgA in Addition to IgG Anti-dsDNA Help to Identify Glomerulonephritis and Active Disease. *PLoS ONE* [Internet]. 12. August 2013 [zitiert 27. Mai 2020];8(8). Verfügbar unter:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3741383/>
10. Witte T, Hartung K, Matthias T, Sachse C, Fricke M, Deicher H, u. a. Association of IgA anti-dsDNA antibodies with vasculitis and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int.* 1. August 1998;18(2):63–9.

11. Gharibi T, Majidi J, Kazemi T, Dehghanzadeh R, Motallebnezhad M, Babaloo Z. Biological effects of IL-21 on different immune cells and its role in autoimmune diseases. *Immunobiology*. Februar 2016;221(2):357–67.
12. Jordan N, D’Cruz DP. Belimumab for the treatment of systemic lupus erythematosus. *Expert Rev Clin Immunol*. 1. Februar 2015;11(2):195–204.
13. Frieri M, Heuser W, Bliss J. Efficacy of novel monoclonal antibody belimumab in the treatment of lupus nephritis. *J Pharmacol Pharmacother*. 4. Januar 2015;6(2):71.
14. Borchers AT, Leibushor N, Naguwa SM, Cheema GS, Shoenfeld Y, Gershwin ME. Lupus nephritis: A critical review. *Autoimmun Rev*. Dezember 2012;12(2):174–94.
15. Imran TF, Yick F, Verma S, Estiverne C, Ogbonnaya-Odor C, Thiruvardsothy S, u. a. Lupus nephritis: an update. *Clin Exp Nephrol*. 1. Februar 2016;20(1):1–13.
16. Vilas-Boas A, Morais SA, Isenberg DA. Belimumab in systemic lupus erythematosus. *RMD Open*. 1. März 2015;1(1):e000011.
17. Mathian A, Arnaud L, Amoura Z. Physiopathologie du lupus systémique : le point en 2014. *Rev Médecine Interne*. August 2014;35(8):503–11.
18. Rao H, Zeng Q, Liang Y, Xiao C, Xie S, Xu X. Correlation between TLR9 Expression and Cytokine Secretion in the Clinical Diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2015 [zitiert 7. April 2017];2015. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4589624/>
19. Papadimitraki ED, Choulaki C, Koutala E, Bertias G, Tsatsanis C, Gergianaki I, u. a. Expansion of toll-like receptor 9–expressing B cells in active systemic lupus erythematosus: Implications for the induction and maintenance of the autoimmune process. *Arthritis Rheum*. 1. November 2006;54(11):3601–11.
20. Santiago-Raber M-L, Baudino L, Izui S. Emerging roles of TLR7 and TLR9 in murine SLE. *J Autoimmun*. November 2009;33(3–4):231–8.
21. Rifkin IR, Leadbetter EA, Busconi L, Viglianti G, Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease. *Immunol Rev*. 1. April 2005;204(1):27–42.
22. Lafyatis R, York M, Marshak-Rothstein A. Antimalarial agents: Closing the gate on toll-like receptors? *Arthritis Rheum*. 1. Oktober 2006;54(10):3068–70.
23. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. Juli 2004;4(7):499–511.
24. Moore KW, Malefyt R de W, Coffman RL, O’Garra A. Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001;19(1):683–765.
25. Wang T, Mei Y, Li Z. Research Progress on Regulatory B Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *BioMed Res Int* [Internet]. 22. Mai 2019 [zitiert 4. April 2021];2019. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6556307/>

26. Saxena A, Khosraviani S, Noel S, Mohan D, Donner T, Hamad ARA. Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. *Cytokine*. Juli 2015;74(1):27–34.
27. Peng H, Wang W, Zhou M, Li R, Pan H-F, Ye D-Q. Role of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 1. September 2013;32(9):1255–66.
28. Llorente L, Richaud-Patin Y, Couderc J, Alarcon-Segovia D, Ruiz-Soto R, Alcocer-Castillejos N, u. a. Dysregulation of interleukin-10 production in relatives of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1. August 1997;40(8):1429–35.
29. Watanabe R, Ishiura N, Nakashima H, Kuwano Y, Okochi H, Tamaki K, u. a. Regulatory B Cells (B10 Cells) Have a Suppressive Role in Murine Lupus: CD19 and B10 Cell Deficiency Exacerbates Systemic Autoimmunity. *J Immunol*. 1. Mai 2010;184(9):4801–9.
30. Yin Z, Bahtiyar G, Zhang N, Liu L, Zhu P, Robert ME, u. a. IL-10 Regulates Murine Lupus. *J Immunol*. 15. August 2002;169(4):2148–55.
31. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, DiLillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, u. a. Characterization of a rare IL-10–competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*. 13. Januar 2011;117(2):530–41.
32. Lauwerys BR, Garot N, Renaud JC, Houssiau FA. Interleukin-10 blockade corrects impaired in vitro cellular immune responses of systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum*. September 2000;43(9):1976–81.
33. Llorente L, Weiping Z. Role of interleukin 10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus. *J Exp Med*. 1. März 1995;181(3):839–44.
34. Drury AN, Szent-Györgyi A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart¹. *J Physiol*. 25. November 1929;68(3):213–37.
35. Antonioli L, Csóka B, Fornai M, Colucci R, Kókai E, Blandizzi C, u. a. Adenosine and inflammation: what’s new on the horizon? *Drug Discov Today*. August 2014;19(8):1051–68.
36. Haskó G, Cronstein BN. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol*. Januar 2004;25(1):33–9.
37. Haskó G, Linden J, Cronstein B, Pacher P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 1. September 2008;7(9):nrd2638.
38. Haskó G, Kuhel DG, Chen J-F, Schwarzschild MA, Deitch EA, Mabley JG, u. a. Adenosine inhibits IL-12 and TNF- α production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. *FASEB J*. 10. Januar 2000;14(13):2065–74.
39. 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.* 1. März 2000;43(3):656–63.
40. Neshar G, Mates M, Zevin S. Effect of caffeine consumption on efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1. Februar 2003;48(2):571–2.
41. Saze Z, Schuler PJ, Hong C-S, Cheng D, Jackson EK, Whiteside TL. Adenosine production by human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells. *Blood.* 4. Juli 2013;122(1):9–18.
42. Figueiró F, Muller L, Funk S, Jackson EK, Battastini AMO, Whiteside TL. Phenotypic and functional characteristics of CD39^{high} human regulatory B cells (Breg). *OncoImmunology.* 1. Februar 2016;5(2):e1082703.
43. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function. *Immunity.* 21. April 2015;42(4):607–12.
44. Sakowicz-Burkiewicz M, Kocbuch K, Grden M, Maciejewska I, Szutowicz A, Pawelczyk T. Impact of adenosine receptors on immunoglobulin production by human peripheral blood B lymphocytes. *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc.* Dezember 2012;63(6):661–8.
45. Bortoluzzi A, Vincenzi F, Govoni M, Padovan M, Ravani A, Borea PA, u. a. A2A adenosine receptor upregulation correlates with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2016;18:192.
46. Pohanka M. The perspective of caffeine and caffeine derived compounds in therapy. *Bratisl Lek Listy.* 2015;116(9):520–30.
47. Horrigan LA, Kelly JP, Connor TJ. Immunomodulatory effects of caffeine: Friend or foe? *Pharmacol Ther.* 1. September 2006;111(3):877–92.
48. Wuttke NJ, Macardle PJ, Zola H. Blood group antibodies are made by CD5⁺ and by CD5⁻ B cells. *Immunol Cell Biol.* Oktober 1997;75(5):478–83.
49. Choi YS, Dieter JA, Rothausler K, Luo Z, Baumgarth N. B-1 cells in the bone marrow are a significant source of natural IgM. *Eur J Immunol.* 1. Januar 2012;42(1):120–9.
50. Moreau A, Blair PA, Chai J-G, Ratnasothy K, Stolarczyk E, Alhabbab R, u. a. Transitional-2 B cells acquire regulatory function during tolerance induction and contribute to allograft survival. *Eur J Immunol.* 1. März 2015;45(3):843–53.
51. Hammad H, Vanderkerken M, Pouliot P, Deswarte K, Toussaint W, Vergote K, u. a. Transitional B cells commit to marginal zone B cell fate by Taok3-mediated surface expression of ADAM10. *Nat Immunol.* März 2017;18(3):313–20.
52. Hoffman W, Lakkis FG, Chalasani G. B Cells, Antibodies, and More. *Clin J Am Soc Nephrol.* 1. Juli 2016;11(1):137–54.
53. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood.* 1. September 2008;112(5):1570–80.

54. Maïga I, Bonnaure G, Tremblay Rochette J, Néron S. Human CD38^{hi}CD138. *J Immunol Res.* 23. Dezember 2014;2014:e635108.
55. Crespo M, Heidt S, Redondo D, Pascual J. Monitoring B cell subsets and alloreactivity in kidney transplantation. *Transplant Rev.* April 2015;29(2):45–52.
56. Cerutti A, Cols M, Puga I. Marginal zone B cells: virtues of innatelike antibody-producing lymphocytes. *Nat Rev Immunol.* Februar 2013;13(2):118–32.
57. Kessel A, Haj T, Peri R, Snir A, Melamed D, Sabo E, u. a. Human CD19⁺CD25^{high} B regulatory cells suppress proliferation of CD4⁺ T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. *Autoimmun Rev.* Juli 2012;11(9):670–7.
58. Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, u. a. CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity.* 29. Januar 2010;32(1):129–40.
59. Tedder TF. CD19: a promising B cell target for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* Oktober 2009;5(10):572–7.
60. Morbach H, Schickel J-N, Cunningham-Rundles C, Conley ME, Reisli I, Franco JL, u. a. CD19 controls Toll-like receptor 9 responses in human B cells. *J Allergy Clin Immunol.* März 2016;137(3):889-898.e6.
61. Tedder TF, Inaoki M, Sato S. The CD19–CD21 Complex Regulates Signal Transduction Thresholds Governing Humoral Immunity and Autoimmunity. *Immunity.* Februar 1997;6(2):107–18.
62. Arredouani MS, Bhasin MK, Sage DR, Dunn LK, Gill MB, Agnani D, u. a. Analysis of Host Gene Expression Changes Reveals Distinct Roles for the Cytoplasmic Domain of the Epstein-Barr Virus Receptor/CD21 in B-Cell Maturation, Activation, and Initiation of Virus Infection. *J Virol.* 15. Mai 2014;88(10):5559–77.
63. Asokan R, Hua J, Young KA, Gould HJ, Hannan JP, Kraus DM, u. a. Characterization of Human Complement Receptor Type 2 (CR2/CD21) as a Receptor for IFN- α : A Potential Role in Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol.* 1. Juli 2006;177(1):383–94.
64. Asokan R, Banda NK, Szakonyi G, Chen XS, Holers VM. Human complement receptor 2 (CR2/CD21) as a receptor for DNA: Implications for its roles in the immune response and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE). *Mol Immunol.* Januar 2013;53(1–2):99–110.
65. Boackle SA, Holers VM, Chen X, Szakonyi G, Karp DR, Wakeland EK, u. a. Cr2, a Candidate Gene in the Murine Sle1c Lupus Susceptibility Locus, Encodes a Dysfunctional Protein. *Immunity.* November 2001;15(5):775–85.
66. Prodeus AP, Goerg S, Shen L-M, Pozdnyakova OO, Chu L, Alicot EM, u. a. A Critical Role for Complement in Maintenance of Self-Tolerance. *Immunity.* November 1998;9(5):721–31.
67. Wilson JG, Ratnoff WD, Schur PH, Fearon DT. Decreased expression of the C3b/C4b receptor (CR1) and the C3d receptor (CR2) on B lymphocytes and of CR1 on

- neutrophils of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1. Juni 1986;29(6):739–47.
68. Salzer E, Daschkey S, Choo S, Gombert M, Santos-Valente E, Ginzel S, u. a. Combined immunodeficiency with life-threatening EBV-associated lymphoproliferative disorder in patients lacking functional CD27. *Haematologica.* 1. März 2013;98(3):473–8.
 69. Nolte MA, Van Olfen RW, Van Gisbergen KPJM, Van Lier RAW. Timing and tuning of CD27–CD70 interactions: the impact of signal strength in setting the balance between adaptive responses and immunopathology. *Immunol Rev.* 1. Mai 2009;229(1):216–31.
 70. Shubinsky G, Schlesinger M. The CD38 Lymphocyte Differentiation Marker: New Insight into Its Ectoenzymatic Activity and Its Role as a Signal Transducer. *Immunity.* 1. September 1997;7(3):315–24.
 71. Aksoy P, White TA, Thompson M, Chini EN. Regulation of intracellular levels of NAD: A novel role for CD38. *Biochem Biophys Res Commun.* 14. Juli 2006;345(4):1386–92.
 72. Hartman WR, Pellemounter LL, Moon I, Kalari K, Liu M, Wu T-Y, u. a. CD38 expression, function, and gene resequencing in a human lymphoblastoid cell line-based model system. *Leuk Lymphoma.* Juli 2010;51(7):1315–25.
 73. Carey DJ. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J.* 1. Oktober 1997;327(1):1–16.
 74. Minowa K, Amano H, Nakano S, Ando S, Watanabe T, Nakiri Y, u. a. Elevated serum level of circulating syndecan-1 (CD138) in active systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity.* August 2011;44(5):357–62.
 75. Schena F, Volpi S, Faliti CE, Penco F, Santi S, Proietti M, u. a. Dependence of Immunoglobulin Class Switch Recombination in B Cells on Vesicular Release of ATP and CD73 Ectonucleotidase Activity. *Cell Rep.* 27. Juni 2013;3(6):1824–31.
 76. Kim E-S, Ackermann C, Tóth I, Dierks P, Eberhard JM, Wroblewski R, u. a. Down-regulation of CD73 on B cells of patients with viremic HIV correlates with B cell activation and disease progression. *J Leukoc Biol.* 13. Februar 2017;jlb.5A0816-346R.
 77. Higgins J, Green S. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* Version 5.1.0 [updated March 2011] [Internet]. [zitiert 8. Juni 2017]. Verfügbar unter: http://handbook.cochrane.org/chapter_9/9_2_3_2_the_standardized_mean_difference.htm
 78. Abreu MT, Carvalheiro H, Rodrigues-Sousa T, Domingos A, Segorbe-Luis A, Rodrigues-Santos P, u. a. Alterations in the peripheral blood B cell subpopulations of multidrug-resistant tuberculosis patients. *Clin Exp Med.* 1. November 2014;14(4):423–9.
 79. Suryani S, Fulcher DA, Santner-Nanan B, Nanan R, Wong M, Shaw PJ, u. a. Differential expression of CD21 identifies developmentally and functionally distinct subsets of human transitional B cells. *Blood.* 21. Januar 2010;115(3):519–29.

80. Meyer-Bahlburg A, Andrews SF, Yu KOA, Porcelli SA, Rawlings DJ. Characterization of a late transitional B cell population highly sensitive to BAFF-mediated homeostatic proliferation. *J Exp Med.* 21. Januar 2008;205(1):155–68.
81. Perez-Andres M, Paiva B, Nieto WG, Caraux A, Schmitz A, Almeida J, u. a. Human peripheral blood B-cell compartments: A crossroad in B-cell traffic. *Cytometry B Clin Cytom.* 1. Januar 2010;78B(S1):S47–60.
82. Jackson SM, Wilson PC, James JA, Capra JD. Chapter 5 Human B Cell Subsets. In: *Immunology B-A* in, Herausgeber. Academic Press; 2008 [zitiert 23. Mai 2017]. S. 151–224. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065277608004057>
83. Muema DM, Macharia GN, Hassan AS, Mwaringa SM, Fegan GW, Berkley JA, u. a. Control of Viremia Enables Acquisition of Resting Memory B Cells with Age and Normalization of Activated B Cell Phenotypes in HIV-Infected Children. *J Immunol.* 1. August 2015;195(3):1082–91.
84. Caraux A, Klein B, Paiva B, Bret C, Schmitz A, Fuhler GM, u. a. Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138– and CD138+ plasma cells. *Haematologica.* 1. Juni 2010;95(6):1016–20.
85. Kosalka J, Jakiela B, Musial J. Changes of memory B- and T-cell subsets in lupus nephritis patients. *Folia Histochem Cytobiol.* 2016;54(1):32–41.
86. Boldt A, Borte S, Fricke S, Kentouche K, Emmrich F, Borte M, u. a. Eight-color immunophenotyping of T-, B-, and NK-cell subpopulations for characterization of chronic immunodeficiencies. *Cytometry B Clin Cytom.* 1. Mai 2014;86(3):191–206.
87. Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood.* 1. Juni 2005;105(11):4390–8.
88. Frasca D, Diaz A, Romero M, Blomberg BB. Human peripheral late/exhausted memory B cells express a senescent-associated secretory phenotype and preferentially utilize metabolic signaling pathways. *Exp Gerontol.* Januar 2017;87, Part A:113–20.
89. Doi H, Tanoue S, Kaplan DE. Peripheral CD27–CD21– B-cells represent an exhausted lymphocyte population in hepatitis C cirrhosis. *Clin Immunol.* Februar 2014;150(2):184–91.
90. Seifert M, Przekopowicz M, Taudien S, Lollies A, Ronge V, Drees B, u. a. Functional capacities of human IgM memory B cells in early inflammatory responses and secondary germinal center reactions. *Proc Natl Acad Sci.* 2. Oktober 2015;112(6):E546–55.
91. Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, Ferrero E, Horenstein AL, Ortolan E, u. a. Evolution and Function of the ADP Ribosyl Cyclase/CD38 Gene Family in Physiology and Pathology. *Physiol Rev.* 1. Juli 2008;88(3):841–86.

92. Dörner T, Jacobi AM, Lee J, Lipsky PE. Abnormalities of B cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol Methods*. 5. Januar 2011;363(2):187–97.
93. Dörner T, Giesecke C, Lipsky PE. Mechanisms of B cell autoimmunity in SLE. *Arthritis Res Ther*. 2011;13:243.
94. Pozdzik A, Beukinga I, Gu-Trantien C, Willard-Gallo K, Nortier J, Ile, u. a. Circulating (CD3–CD19+CD20–IgD–CD27highCD38high) Plasmablasts: A Promising Cellular Biomarker for Immune Activity for Anti-PLA2R1 Related Membranous Nephropathy? *Mediators Inflamm*. 14. Juli 2016;2016:e7651024.
95. Odendahl M, Jacobi A, Hansen A, Feist E, Hiepe F, Burmester GR, u. a. Disturbed Peripheral B Lymphocyte Homeostasis in Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol*. 15. November 2000;165(10):5970–9.
96. Vossenkämper A, Lutalo PMK, Spencer J. Translational Mini-Review Series on B cell subsets in disease. Transitional B cells in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome: clinical implications and effects of B cell-targeted therapies. *Clin Exp Immunol*. 1. Januar 2012;167(1):7–14.
97. Lee J, Kuchen S, Fischer R, Chang S, Lipsky PE. Identification and Characterization of a Human CD5+ Pre-Naive B Cell Population. *J Immunol*. 1. April 2009;182(7):4116–26.
98. Jacobi AM, Odendahl M, Reiter K, Bruns A, Burmester GR, Radbruch A, u. a. Correlation between circulating CD27high plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2003;48(5):1332–42.
99. Zhu L, Yin Z, Ju B, Zhang J, Wang Y, Lv X, u. a. Altered frequencies of memory B cells in new-onset systemic lupus erythematosus patients. *Clin Rheumatol*. 1. Januar 2018;37(1):205–12.
100. Levy E, Ambrus J, Kahl L, Molina H, Tung K, Holers VM. T lymphocyte expression of complement receptor 2 (CR2/CD21): a role in adhesive cell-cell interactions and dysregulation in a patient with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol*. 1. November 1992;90(2):235–44.
101. Marquart HV, Svendsen A, Rasmussen JM, Nielsen CH, Junker P, Svehag S-E, u. a. Complement receptor expression and activation of the complement cascade on B lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol*. 1. Juli 1995;101(1):60–5.
102. Anolik JH, Barnard J, Owen T, Zheng B, Kemshetti S, Looney RJ, u. a. Delayed memory B cell recovery in peripheral blood and lymphoid tissue in systemic lupus erythematosus after B cell depletion therapy. *Arthritis Rheum*. 1. September 2007;56(9):3044–56.
103. Iwata S, Tanaka Y. B-cell subsets, signaling and their roles in secretion of autoantibodies. *Lupus*. 1. Juli 2016;25(8):850–6.

104. Matsumoto M, Baba A, Yokota T, Nishikawa H, Ohkawa Y, Kayama H, u. a. Interleukin-10-Producing Plasmablasts Exert Regulatory Function in Autoimmune Inflammation. *Immunity*. 18. Dezember 2014;41(6):1040–51.
105. Amu S, Ruffin N, Rethi B, Chiodi F. Impairment of B-cell functions during HIV-1 infection : AIDS [Internet]. LWW. [zitiert 13. Juni 2017]. Verfügbar unter: http://journals.lww.com/aidsonline/Fulltext/2013/09240/Impairment_of_B_cell_functions_during_HIV_1.1.aspx
106. Kardava L, Moir S, Shah N, Wang W, Wilson R, Buckner CM, u. a. Abnormal B cell memory subsets dominate HIV-specific responses in infected individuals. *J Clin Invest*. 1. Juli 2014;124(7):3252–62.
107. Moir S, Fauci AS. B-cell exhaustion in HIV infection: the role of immune acti... : Current Opinion in HIV and AIDS [Internet]. LWW. [zitiert 13. Juni 2017]. Verfügbar unter: http://journals.lww.com/co-hivandaids/Fulltext/2014/09000/B_cell_exhaustion_in_HIV_infection___the_role_of.8.aspx
108. Adlowitz DG, Barnard J, Bear JN, Cistrone C, Owen T, Wang W, u. a. Expansion of Activated Peripheral Blood Memory B Cells in Rheumatoid Arthritis, Impact of B Cell Depletion Therapy, and Biomarkers of Response. *PLOS ONE*. 5. Juni 2015;10(6):e0128269.
109. Mahajan A, Herrmann M, Muñoz LE. Clearance Deficiency and Cell Death Pathways: A Model for the Pathogenesis of SLE. *Front Immunol* [Internet]. 8. Februar 2016;7. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4745266/>
110. Zorro S, Arias M, Riaño F, Paris S, Ramírez L, Uribe O, u. a. Response to ODN-CpG by B Cells from patients with systemic lupus erythematosus correlates with disease activity. *Lupus*. 1. Juli 2009;18(8):718–26.
111. Nakano S, Morimoto S, Suzuki J, Nozawa K, Amano H, Tokano Y, u. a. Role of pathogenic auto-antibody production by Toll-like receptor 9 of B cells in active systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*. 1. Februar 2008;47(2):145–9.
112. Heinemann K, Wilde B, Hoerning A, Tebbe B, Kribben A, Witzke O, u. a. Decreased IL-10+ regulatory B cells (Bregs) in lupus nephritis patients. *Scand J Rheumatol*. 3. Juli 2016;45(4):312–6.
113. Olsen NJ, Karp DR. Autoantibodies and SLE—the threshold for disease. *Nat Rev Rheumatol*. März 2014;10(3):181–6.
114. Werwitzke S, Trick D, Kamino K, Matthias T, Kniesch K, Schlegelberger B, u. a. Inhibition of lupus disease by anti–double-stranded DNA antibodies of the IgM isotype in the (NZB × NZW)F1 mouse. *Arthritis Rheum*. 1. November 2005;52(11):3629–38.
115. Witte T. IgM Antibodies Against dsDNA in SLE. *Clin Rev Allergy Immunol*. 1. Juni 2008;34(3):345–7.
116. DiLillo DJ, Matsushita T, Tedder TF. B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 1. Januar 2010;1183(1):38–57.

117. Han J-W, Zheng H-F, Cui Y, Sun L-D, Ye D-Q, Hu Z, u. a. Genome-wide association study in a Chinese Han population identifies nine new susceptibility loci for systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* November 2009;41(11):1234–7.
118. Ishida H, Muchamuel T, Sakaguchi S, Andrade S, Menon S, Howard M. Continuous administration of anti-interleukin 10 antibodies delays onset of autoimmunity in NZB/W F1 mice. *J Exp Med.* 1. Januar 1994;179(1):305–10.
119. Llorente L, Richaud-Patin Y. The role of interleukin-10 in systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun.* Juni 2003;20(4):287–9.
120. Iris M, Tsou P-S, Sawalha AH. Caffeine inhibits STAT1 signaling and downregulates inflammatory pathways involved in autoimmunity. *Clin Immunol.* 1. Juli 2018;192:68–77.
121. Badshah H, Ikram M, Ali W, Ahmad S, Hahm JR, Kim MO. Caffeine May Abrogate LPS-Induced Oxidative Stress and Neuroinflammation by Regulating Nrf2/TLR4 in Adult Mouse Brains. *Biomolecules.* November 2019;9(11):719.
122. Navalta JW, Fedor EA, Schafer MA, Lyons TS, Tibana RA, Pereira GB, u. a. Caffeine affects CD8+ lymphocyte apoptosis and migration differently in naïve and familiar individuals following moderate intensity exercise. *Int J Immunopathol Pharmacol.* Juni 2016;29(2):288–94.
123. Saiki S, Sasazawa Y, Imamichi Y, Kawajiri S, Fujimaki T, Tanida I, u. a. Caffeine induces apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR/p70S6K inhibition. *Autophagy.* Februar 2011;7(2):176–87.
124. Shi J, Benowitz NL, Denaro CP, Sheiner LB. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of caffeine: Tolerance to pressor effects. *Clin Pharmacol Ther.* 1993;53(1):6–14.
125. Fredholm BB, Bättig K, Holmén J, Nehlig A, Zvartau EE. Actions of Caffeine in the Brain with Special Reference to Factors That Contribute to Its Widespread Use. *Pharmacol Rev.* 1. März 1999;51(1):83–133.
126. Orefice V, Ceccarelli F, Barbati C, Lucchetti R, Olivieri G, Cipriano E, u. a. Caffeine intake influences disease activity and clinical phenotype in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus.* 1. Oktober 2020;29(11):1377–84.