

Aus der Klinik für Rheumatologie der Heinrich-Heine-
Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Jörg Distler

Charakterisierung der Adenosinkaskade in B-Zellen bei Lupus
erythematoses Patienten

Dissertation

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

vorgelegt von

Merle Louisa Renate Schallehn

2023

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Georg Pongratz

Zweitgutachter: Prof. Dr. Hans Neubauer

Für meine Familie.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht

Hesse J, Siekierka-Harreis M, Steckel B, Alter C, Schallehn M, Honke N, Marie-Laure Schnieringer M-L, Wippich M, Braband R, Schneider M, Surowy H, Wieczorek D, Schrader J, Pongratz G. Profound inhibition of CD73-dependent formation of anti-inflammatory adenosine in B cells of SLE patients. *EBioMedicine* 2021; 73:103616.

Zusammenfassung deutsch

Der systemische Lupus erythematoses (SLE) gehört zum Formenkreis der rheumatischen Autoimmunerkrankungen. Sein heterogenes Krankheitsbild macht ihn oft schwer zu diagnostizieren. Von Hautveränderungen wie dem Schmetterlingserythem über den Befall unterschiedlicher Körperregionen (Niere, Gelenke, ZNS) bis hin zu laborchemischen Veränderungen (antinukleäre Antikörper gegen dsDNA) bietet diese Krankheit eine Vielzahl unterschiedlicher Symptome und somit zu untersuchende Aspekte. Dies erklärt auch, warum der systemische Lupus erythematoses sowohl in seiner Pathogenese als auch in vielen klinischen Aspekten längst nicht bis in alle wichtigen Details aufgeklärt ist (1, 2). Außerdem scheint Adenosin, seine Entstehung und Verstoffwechslung, beim SLE eine entscheidende Rolle bei der Krankheitsentstehung zu spielen (3).

Ziel dieser Arbeit war es, die Adenosinkaskade von SLE B-Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollen näher zu untersuchen. Die Identifizierung und Untersuchung verschiedener Enzyme der Adenosinkaskade und der Adenosinrezeptoren (AR) (CD38, CD39, ADA, CD203a, CD203c, CD157, CD73, Adenosinrezeptor 1, 2_A, 2_B, 3) mittels quantitativer Echtzeit-PCR bei B-Zellen von SLE Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden zeigten bereits einige Unterschiede. Alle Transkripte konnten nachgewiesen werden, jedoch stellte sich heraus, dass CD73, das Schlüsselenzym der Adenosinkaskade, bei den SLE Patienten signifikant vermehrt exprimiert wird. In Zusammenschau mit Ergebnissen von Schrader et al. scheint CD73 bei den SLE Patienten jedoch defekt zu sein. Alle weiteren untersuchten Enzyme und auch die Adenosinrezeptoren von B-Zellen wiesen keine deutlichen signifikanten Unterschiede zwischen SLE Patienten und gesunden Probanden auf.

Ergänzend wurde die Verteilung von B-Zell-Untergruppen und deren Expression von CD73 in SLE Patienten und gesunden Probanden mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hier zeigten sich in Bezug auf einige Zellreihen Unterschiede in der Verteilung sowie in der CD73 Expression. Allerdings variieren die Ergebnisse dieser Arbeit und weiterer Studien teils deutlich, was größtenteils an der schweren Vergleichbarkeit durch diverse beeinflussende Faktoren (Patientenalter, Aktivitätsstatus des SLE, Therapie, Vorerkrankungen und Art des Gewebes) liegt.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Verteilung der peripheren B-Zellsubpopulationen gestört ist und CD73 auf manchen Subpopulation bei SLE Patienten vermehrt exprimiert wird. CD73 ist jedoch dysfunktional, woraus man einen therapeutischen Angriffspunkt in der Erkrankung des systemischen Lupus erythematoses ableiten könnte.

Zusammenfassung englisch

Systemic lupus erythematosus is a rheumatic autoimmune disease. Its heterogeneous clinical picture often makes it difficult to diagnose. From skin changes such as butterfly erythema to the affection of different body regions (kidneys, joints, CNS) and laboratory chemical changes (antinuclear antibodies against dsDNA), this disease offers a variety of different symptoms and thus different aspects to be investigated. This also explains why systemic lupus erythematosus is far from being fully understood in its pathogenesis as well as in many clinical aspects. For example, some working groups found out a different distribution of lymphocyte subgroups in SLE patients compared to healthy controls (1, 2). In addition, adenosine, its synthesis and metabolism, appears to play a decisive role in the development of the disease (3).

The aim of this work was to examine the adenosine cascade of B-cells in the human SLE compared to healthy controls. The identification and examination of various enzymes of the adenosine cascade and adenosine receptors (CD38, CD39, ADA, CD203a, CD203c, CD157, CD73, adenosine receptor 1, 2A, 2B, 3) using quantitative real-time PCR already showed some differences between B-cells of SLE patients and healthy controls. All transcripts were detected, but it turned out that CD73, the key enzyme of the adenosine cascade, is significantly more expressed in SLE patients. In combination with results from Schrader et al., however, CD73 appears to be damaged in SLE patients. All the other enzymes studied, as well as the adenosine receptors, they showed no significant differences between SLE patients and healthy controls.

In addition, the distribution of B cell subsets and their expression of CD73 in SLE patients and healthy volunteers was investigated using Fluorescence-activated Cell Sorting. Here, differences in the distribution as well as in the CD73 expression were found with respect to some cell series. However, the results of this work and other studies vary significantly, mostly due to the severe comparability and various influencing factors (patient age, activity status of SLE, therapy, pre-existing diseases and tissue type).

In conclusion, the distribution of peripheral B cell subpopulations is disturbed and CD73 is increased expressed on some subpopulations in SLE patients. However, CD73 is dysfunctional, from which a therapeutic target in the disease of systemic lupus erythematosus may be derived.

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm	CD.....	<i>Cluster of Differentiation</i>
µl	Mikroliter	CHO.....	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
µm	Mikrometer	CNT1&2	<i>Concentrative nucleoside transporter 1&2</i>
A1R.....	A ₁ -Adenosinrezeptor	Co ²⁺	Cobalt
A2AR	A _{2A} -Adenosinrezeptor	COOH.....	Carboxygruppe
A2BR.....	A _{2B} -Adenosinrezeptor	CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
A3R.....	A ₃ -Adenosinrezeptor	CTP.....	Cytidintriphosphat
AC.....	Adenylatcyclase	Cys.....	Cystein
ACR.....	Apyrase- konservierte Region	cyto 5' - NT	cytosolisches CD73
ADA	Adenosindesaminase	dGTP.....	desoxy- Guanosintriphosphat
Ado.....	Adenosin	DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
ADORA1.....	A ₁ - Adenosinrezeptor	dNTPs.....	desoxy- Nukleotidtriphosphate
ADORA2A.....	A _{2A} - Adenosinrezeptor	dsDNA	<i>double-stranded deoxyribonucleic acid</i>
ADORA2B.....	A _{2B} - Adenosinrezeptor	dUTP.....	desoxy- Uridintriphosphat
ADORA3.....	A ₃ - Adenosinrezeptor	EDTA	<i>Ethylene diamine tetraacetic acid</i>
ADP.....	Adenosindiphosphat	Ekto-5'-NTase	Ekto-5'-Nukleotidase
Ag.....	Antigen	ENPP	Ektonukleotidpyrophosphatase
AIDS .	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>	ENT1&2 .	<i>Equilibrative nucleoside transporter 1&2</i>
AK.....	Adenosinkinase	ENTPDase 1	Ekto-Nukleosidtriphosphat-Diphosphohydrolase 1
AMP	Adenosinmonophosphat	Epac	<i>exchange protein directly activated by cAMP</i>
AP.....	Alkalische Phosphatase	ERK1/2.	<i>extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>
APC.....	Allophycocyanin	FACS	<i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i>
AR.....	Adenosinrezeptor	FcR	<i>Fc receptor</i>
ATP.....	Adenosintriphosphat	FITC	Fluoreszein-Isotiozyanat
AT-Paar	Adenin-Thymin-Paar	FSC.....	<i>forward scatter</i>
ATX.....	Autotaxin	Fwd.....	<i>forward</i>
B2M.....	Beta- 2- Microglobulin	g	g- Kraft
BCR.....	B- Zell- Rezeptor	GCAP ...	alkalische Phosphatase der Keimzelle
BST-1	<i>bone marrow stromal cell antigen 1</i>	GC-Paares.....	Guanin-Cytosin-Paar
C/EBPbeta.	<i>CCAAT-enhancer-binding proteins beta</i>	Glu	Glutaminsäure
Ca ²⁺	Calcium		
cADPR .	cyclische Adenosindiphosphat Ribose		
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat		

GPI	Glycosylphosphatidylinositol	pH	potentia Hydrogenii
G-Protein	Guanosintriphosphat bindendes Protein	PI3K.....	Phosphatidylinositol-3-Kinase
GTP	Guanosintriphosphat	PKA	Proteinkinase A
HC	<i>Healthy control</i>	PKC	Proteinkinase C
IAP	intestinale alkalische Phosphatase	PLAP	plazentale alkalische Phosphatase
IFNs.....	Interferonen	PLC.....	Phospholipase C
Ig Immunglobulin		PNP.....	Purinnucleosidphosphorylase
IL-10.....	Interleukin 10	qRT-PCR....	<i>quantitative Realtime Polymerase Chain Reaction</i>
IL-16.....	Interleukin 16	Rap1.....	<i>DNA-binding protein RAP1</i>
kDa	Kilodalton	Ras	<i>Rat sarcoma protein</i>
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>	Rev.....	<i>Reverse</i>
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase	RNA.....	<i>Ribonucleic acid</i>
ml	Milliliter	ROS	reaktive Sauerstoffspezies
mm	Millimeter	rpm.....	<i>revolutions per minute</i>
mM	Einheit der Stoffmengenkonzentration	SCID	<i>severe combined immunodeficiency disease</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>	Ser.....	Serin
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid	SLE.....	Systemischer Lupus erythematosus
NAMN.....	<i>Nicotinamide mononucleotide</i>	SLEDAI.....	<i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index</i>
NC-IUPHAR.....	<i>Nomenclature and Standards Committee of the International Union of Basic and Clinical Pharmacology</i>	Src.....	<i>Sarcoma tyrosine-protein-kinase</i>
ng.....	Nanogramm	SSC	<i>sideward scatter</i>
NH ₂	Aminogruppe	TCR	T- Zell- Rezeptor
NK.....	Natürliche Killerzelle	TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
nM.....	Nanomolar	Th1.....	T Helferzelle Typ 1
NPP-Familie.....	Nukleotidpyrophosphatase-Familie	Th2.....	T Helferzelle Typ 2
NT(D)P Rezeptor		TNAP....	unspezifische alkalische Phosphatase
. Nukleotidtriphosphat(diphosphat) Rezeptor		TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
NTPD	Nucleosidtriphosphat-Diphosphohydrolase	Tregs.....	Regulatorische T- Zellen
PBMCs ..	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>	TTP	Thymidintriphosphat
PBS.....	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>	UNG	Uracil-N-Glycosylase
PC-1.....	Plasmazellglykoprotein 1	UTP.....	Uridintriphosphat
PCR.....	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	UV-Strahlung	Ultraviolett- Strahlung
PE.....	Phycoerythrin	Zn ²⁺	Zink
PerCP.....	Perdinin Chlorophyll-Protein	ZNS.....	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Systemischer Lupus erythematoses – eine Autoimmunerkrankung mit vielen Facetten.....	1
1.2	Adenosin – ein Molekül mit vielfältiger Wirkung	2
1.2.1	Adenosinrezeptoren und ihre Signaltransduktion	3
1.2.2	Die Adenosinkaskade	6
1.2.2.1	CD39 und CD73	8
1.2.2.2	Weitere Enzyme der Adenosinkaskade	11
1.2.2.2.1	CD203a / CD203c	11
1.2.2.2.2	CD38	12
1.2.2.2.3	Alkalische Phosphatase	12
1.2.2.2.4	CD157	13
1.2.2.2.5	Adenosin-Desaminase	14
1.2.2.2.6	Purin-Nukleosid-Phosphorylase	14
1.3	Zusammenhang zwischen Adenosin und Immunsystem.....	14
1.3.1	Immunsystem im Allgemeinen	14
1.3.2	B-Zellen und ihre Rolle im Immunsystem	15
1.3.3	B-Zellsubpopulationen	16
1.4	Ziele der Arbeit	17
2	Materialliste.....	17
3	Methoden.....	22
3.1	Blutgewinnung	22
3.2	B-Zell-Separation.....	23
3.2.1	Methode.....	23
3.2.2	Durchführung MACS (<i>Magnetic Cell Sorting</i>) Separation.....	23
3.2.3	Zellzählung.....	25
3.3	Durchflusszytometrie (FACS).....	25
3.3.1	Allgemeines Funktionsprinzip der Durchflusszytometrie	25
3.3.2	Durchführung	26
3.3.3	Auswertung – Gating-Strategie	26
3.4	Vorbereitung PCR.....	27
3.4.1	Aufreinigung der RNA.....	27
3.4.2	Synthese der cDNA.....	28
3.5	Realtime PCR.....	29
3.5.1	Prinzip	29

3.5.2	Durchführung	29
3.5.3	Auswertung	31
4	Ethikvotum	32
5	Ergebnisse	33
5.1	Ergebnis Adenosinrezeptoren	33
5.2	Ergebnis Enzyme der Adenosinkaskade	34
5.3	B-Zellsubpopulation.....	36
6	Diskussion	40
6.1	Dysregulation der Adenosinrezeptoren in SLE.....	40
6.2	Erhöhte Expression der Ektoenzyme bei SLE?.....	41
6.3	Verschiebungen in peripheren B-Zellsubpopulationen bei SLE.....	42
6.3.1	Reife, naive B-Zellen (<i>mature naive B cells</i>).....	42
6.3.2	B-Gedächtniszellen (<i>Exhausted memory B cells</i>).....	43
6.3.3	Frühe Plasmablasten (<i>Early plasmablasts</i>)	45
6.3.4	Plasmazellen (<i>Plasmacells</i>).....	45
6.4	CD73 Expression auf B-Zellsubpopulationen.....	46
7	Zusammenfassung und Ausblick.....	47
8	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	49
9	Anhang	64
9.1	Abbildungsverzeichnis	64
9.2	Tabellenverzeichnis.....	64
10	Danksagung	

1 Einleitung

1.1 Systemischer Lupus erythematoses – eine Autoimmunerkrankung mit vielen Facetten

Eine Autoimmunerkrankung beinhaltet chronisch entzündliche Prozesse, bei denen der eigene Körper Antikörper gegen körpereigene Stoffe bildet. Autoimmunerkrankungen bilden nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen und den Tumorerkrankungen die dritthäufigste Erkrankungsgruppe weltweit (4). Es gibt eine Vielzahl heterogener Autoimmunerkrankungen; weltweit sind derzeit (Stand Oktober 2020) ca. 5-8% der Bevölkerung von den verschiedensten Autoimmunerkrankungen betroffen. Der systemische Lupus erythematoses stellt eine von diesen dar (4). Innerhalb der europäischen Bevölkerung sind rund 25-68 von 100.000 Menschen von einem systemischen Lupus erythematoses betroffen (5). Jährlich werden in Nordeuropa 3-5/100.000 Neuerkrankungen verzeichnet (5, 6). Frauen sind rund zehnmal häufiger vom SLE betroffen als Männer (5). Eine erhöhte Häufigkeit des Auftretens der Erkrankung ist neben dem weiblichen Geschlecht auch bei Rauchern festzustellen (5). Die Symptomatik des SLE ist anfangs häufig gekennzeichnet durch unspezifische Symptome wie Fieber, Müdigkeit und Arthralgien, sodass die meisten Patienten erst viele unterschiedliche medizinische Fachdisziplinen aufsuchen, bevor sie einen Rheumatologen besuchen. Somit kommt es meist spät zur richtigen Diagnosestellung (7–9). Klinisch präsentieren sich die SLE Patienten häufig sehr heterogen: Der systemische Lupus erythematoses kann sowohl einen variablen Krankheitsverlauf aufweisen, als auch unterschiedlichste Organe befallen, wobei bei etwa 50% der Patienten eine Lupusnephritis zu finden ist (8, 10). Zur Messung der Aktivität des SLE wird im klinischen Alltag der sogenannte SLEDAI (SLE disease activity index) genutzt. Zur Diagnosestellung des Lupus erythematoses werden sowohl charakteristische klinische Symptome an der Haut (Schmetterlingserythem), an den Gelenken, an den Nieren und am Zentralnervensystem untersucht, als auch bestimmte Laborparameter wie antinukleäre Antikörper gegen doppelsträngige DNA (dsDNA) betrachtet (8, 11). Zhao LD et al. beschreibt, dass bestimmte zirkulierende Antikörper einem bestimmten Organschaden zugeordnet werden können und somit etwas über die Krankheitsaktivität aussagen können (1). So korrelieren hohe antinukleäre Antikörpertiter gegen dsDNA mit der Lupusnephritis und der Krankheitsaktivität (1). Des Weiteren kann man bei SLE Patienten neben den pathophysiologischen dsDNA Antikörpern eine polyklonale B-Zell-Aktivierung mit Produktion von Zytokinen, wie Interferon-Gamma oder dem immunregulatorischen IL-10 finden (12, 13). Zusätzlich spielen gestörte Untergruppen von B-Zellen eine pathogenetisch wichtige Rolle beim SLE (1, 2). Mehrere Arbeitsgruppen beschreiben eine unterschiedliche Verteilung von Lymphozyten-Untergruppen bei SLE Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen und auch Verschiebungen der Lymphozyten-Untergruppen in Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität und Therapie sind beobachtet worden (1, 3).

Insgesamt kann man festhalten, dass der systemische Lupus erythematoses sowohl in seiner Pathogenese als auch in vielen klinischen Aspekten eine sehr heterogene Erkrankung darstellt und längst nicht bis in alle wichtigen Details aufgeklärt ist.

1.2 Adenosin – ein Molekül mit vielfältiger Wirkung

Adenosin ist an vielen wichtigen Vorgängen in unserem Körper beteiligt (3). Ob im kardiovaskulären System (14, 15) bei Stress, im Magen-Darm-Trakt, im zentralen Nervensystem (16), im Gefäßbett (17), im Immunsystem oder bei der Zelldifferenzierung und -proliferation (18): Das Molekül und seine vielfältigen Wirkungsweisen sind in vielen überlebenswichtigen Systemen unseres Körpers zu finden (19, 3) und es dient sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen als Vermittler (20). Unter oxidativem Stress oder Ischämie beispielsweise können die Adenosinspiegel um das 100-fache ansteigen (21, 22).

Als Bestandteil des ATPs ist es in einem der wichtigsten Energielieferanten unseres Körpers enthalten und ein weiteres Adenosinderivat, Adenin, ist es ein Baustein von Nukleotiden und somit wichtig für die genetische Informationsspeicherung (19, 23). Des Weiteren ist es auch als Coenzym in vielen enzymatischen Reaktionen unseres Körpers zu finden oder es wird als Bestandteil von cAMP, einem *second messenger*, zur intrazellulären Signalübertragung benötigt (23). Das zu den Purinen gehörende Adenosin hat modulatorische und regulatorische Wirkung auf Zellen und Gewebe (19, 23).

Adenosin ist physiologisch intrazellulär und extrazellulär zu finden. Das Gleichgewicht zwischen dem extrazellulären und dem intrazellulären Adenosin wird über einen bidirektionalen Adenosintransporter gesteuert, der bei Überschuss innerhalb der Zelle Adenosin in den extrazellulären Bereich pumpen kann (3, 19, 24). Wenn die intrazellulären Level an Adenosin sehr hoch sind, kann Adenosin auch über die Zellmembran diffundieren (24). Extrazellulär kann das Adenosin ansteigen, wenn das Nukleotid Adenin katabolisiert wird oder wenn die Nukleosidtransporter es aus dem intrazellulären Bereich freisetzen (3, 24, 25). Diese Nukleosidtransporter findet man beispielsweise in der Niere (ENT1&2 und CNT1&2). Sie können ein Konzentrationsgefälle zwischen extrazellulär und intrazellulär aufrechterhalten (26–28). Die extrazelluläre Adenosinkonzentration, die unter physiologischen Bedingungen zwischen 30 und 200 nM liegen kann (25), wird auch durch den Abbau von freigesetztem ATP beeinflusst. Anfangs fand man die Freisetzung von ATP nur in Neuronen am synaptischen Spalt (29), jedoch wurden durch weitere Forschung ähnliche purinerge Signalwege wie an den Neuronen gefunden, beispielsweise bei der Aktivierung von Immunzellen (29–31). Umliegende Immunzellen erkennen durch die ATP Freisetzung defekte, apoptotische oder gestresste Zellen (30). Jüngste Ergebnisse haben gezeigt, dass eine Stimulation von neutrophilen Granulozyten und T-Zellen zu einer schnellen Freisetzung von ATP führt. Dies löst wiederum autokrine purinerge Rückkopplungsschleifen aus, die schwache extrazelluläre Reize, die die Zelle von extrazellulär erhält, verstärken können (30). Auch Phagozyten erkennen über dieses „*find me*“-Signal defekte Zellen und können diese beseitigen (30, 32). Die purinerge Signalgebung ist auch entscheidend für die Aktivierung von Inflammasomen und die Zytokinfreisetzung (30, 33). Des Weiteren können auch B-Zellen ATP freisetzen, welches extrazellulär zur vermehrten B-Zell-Proliferation führt (30, 34, 35). Eine weitere, potenzielle Quelle für extrazelluläres Adenosin ist das cAMP. Um jedoch eine hohe Konzentration an cAMP zu generieren, müssten viele Zellen über einen längeren Zeitraum cAMP ausschütten (36).

In den Abbau des ATPs sind die Ektonukleotidasen involviert, die das ATP zu ADP, AMP und letztendlich zu Adenosin abbauen (3, 37, 38) (siehe 1.2.2 Die Adenosinkaskade). Hierbei

desphosphoryliert die 5'-Nukleotidase AMP zu Adenosin und bildet dadurch den entscheidenden Schritt zur Generierung von Adenosin (39, 40). Ist Adenosin vorhanden, kann es außerdem über Rezeptoren (siehe 1.2.1 Adenosinrezeptoren und ihre Signaltransduktion) Einfluss auf die jeweilige Zelle nehmen. Im Zusammenspiel von Enzymen und Rezeptoren wird die Zellaktivierung über den jeweiligen für die Zelle spezifischen purinergen Signalweg reguliert (30, 41, 42). Intrazellulär kann Adenosin über den Metabolismus von ATP bei Stress und über den Abbau von S-Adenosylhomocystein durch die zytoplasmatische S-Adenosylhomocystein-Hydrolase (19, 43, 44) entstehen. Fällt also zu viel Adenosin extrazellulär oder intrazellulär an, sorgt vor allem der bidirektionale Transporter für ein Gleichgewicht unter physiologischen Bedingungen (3, 43, 45). Intrazellulär kann Adenosin auch schnell über die Adenosindesaminase (ADA) zu Inosin abgebaut werden (46, 47) oder über die Adenosinkinase wieder dem Pool der purinen Nukleotide zugeführt werden (3, 43, 45, 48–50). Die ADA findet man auch extrazellulär (47). Entsteht ein Gewebeschaden im Körper und Adenosin wird in größeren Mengen freigesetzt, schafft es der Körper meist nicht schnell genug, Adenosin ins Zytosol zu transportieren, sodass die Konzentration extrazellulär ansteigt (3). In diesem Fall signalisiert Adenosin dem umliegenden Gewebe über auto- und parakrine Wege, dass ein Gewebsdefekt vorliegt und generiert dann über seine Rezeptoren eine Organ protektive Antwort, die Homöostase vermittelt (3).

1.2.1 Adenosinrezeptoren und ihre Signaltransduktion

Adenosin vermittelt seine vielfältigen Effekte über vier verschiedene Rezeptoren. Sie gehören zur Gruppe der P1-Purinorezeptoren, da sie Adenosin als Liganden binden, und stehen somit im Gegensatz zu den P2-Purinorezeptoren, die ATP oder ADP binden (23). Diese vier P1-Rezeptoren tragen jeweils sieben Transmembrandomänen und gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren, sodass an den jeweiligen Rezeptorsubtypen intrazellulär ein GTP bindendes Protein verknüpft ist (3). Die Rezeptoren steuern ihre Wirkung auf die Zelle unter anderem über die Inhibition oder Aktivierung der Adenylatcyclase (AC) (51, 52) und somit über die Absenkung oder die Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration (3, 19, 24). Neueren Erkenntnissen zufolge ist nicht nur das cAMP System mit den Adenosinrezeptoren verknüpft, sondern auch einige andere intrazelluläre Verbindungen (3). Inzwischen weiß man, dass beispielsweise mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) über die Adenosinrezeptoren aktiviert werden können und somit mitogene Signale intrazellulär vermittelt werden (19).

Anfangs teilte man die Adenosinrezeptoren in A1 oder A2 Rezeptoren ein, je nach Grad des Anstiegs von intrazellulärem cAMP (3, 51). Basierend auf anschließenden Studien wurde der A2 Rezeptor, der cAMP ansteigen lässt, in einen A2A Rezeptor (A2AR) mit hoher Adenosinaffinität und einen A2B Rezeptor (A2BR) mit niedrigerer Adenosinaffinität unterteilt (3, 24, 53). Bei dem Versuch die Rezeptoren zu sequenzieren, entdeckte und identifizierte man den A3 Rezeptor (A3R), welcher sich als kaum sensibel gegenüber Xanthin zeigte (24, 54–56). Alle anderen Adenosinrezeptoren können durch Xanthin gehemmt werden. Nach der Nomenklatur, beschlossen von der NC-IUPHAR zum Thema Adenosinrezeptoren, unterscheidet man demnach A1R, A2AR, A2BR und A3R (24, 57, 58). A1R und A3R haben in der Regel inhibitorische Effekte ($G_{i/o}$ gekoppelt), wohin gegen A2AR und A2BR G_s -Proteine aktivieren und somit stimulierende Effekte haben (19). Neben Adenosin können die Rezeptoren, zumindest der A3R, auch durch Inosin aktiviert werden (59, 60).

Durch die Aktivierung des A1 Rezeptors (A1R) wird über eine Untereinheit des G-Proteins die Adenylatcyclase (AC) gehemmt und somit die Bildung von cAMP unterdrückt (24). Die Folge ist meist eine pro-inflammatorische Wirkung, denn die Adhärenz von neutrophilen Granulozyten an das Endothel wird hierdurch verstärkt (61). Des Weiteren können G_q und G_i gekoppelte Rezeptoren (A1R) die Phospholipase C (PLC) aktivieren, was zur Produktion von Diacylglycerol und Inositoltriphosphat und letzten Endes zur intrazellulären Erhöhung von Ca^{2+} und zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) führt (19, 24). Eine intrazelluläre Steigerung von Ca^{2+} aktiviert Lymphozyten, diese Rezeptoraktivierung ist dementsprechend auch pro-inflammatorisch (62). Der inhibitorische Rezeptor A1 aktiviert über seine β -Untereinheit neben der Phospholipase C auch die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), welche das Ras Protein aktiviert und somit die MAPK (hier *extracellular signal-regulated kinases 1/2* (ERK1/2)) Kaskade einschaltet (19, 63). Zusätzlich kann der A1R Kaliumkanäle direkt aktivieren, sowie Q-, P- und N-Typ Calciumkanäle inhibieren (3). Insgesamt wirkt der A1 Rezeptor also pro- und anti-inflammatorisch (3, 43). G. Haskó et al. postuliert, dass A1R Signalübertragungen nicht auf Immunzellen bekannt sind (3). Klinisch betrachtet ist der A1R verantwortlich für chronotrope Effekte von Adenosin, welche relevant sind für die Behandlung supraventrikulärer Tachykardien (64, 65).

Der A3 Rezeptor (A3R) hat eine sehr komplexe Rolle in der Pathophysiologie der Entzündung und der Modulation der Funktion von Immunzellen, wie Zytokinproduktion, Degranulation, Chemotaxis und Proliferation (43, 66). Er spielt eine wichtige Rolle bei der Erleichterung der Zellwanderung aufgrund eines chemotaktischen Stimulus. Außerdem ist der A3 Rezeptor nicht sensibel gegenüber Xanthinen, wie Coffein und Theophyllin, die beide Antagonisten an den anderen Rezeptoren sind (3, 67). Der A3R löst ähnliche Signalkaskaden wie der A1R aus (Abbildung 1) (24) und, wie kürzlich bekannt wurde, kann er auch die MAPK-Kaskade aktivieren (68). Zudem ist bereits eine Verbindung vom A3 Rezeptor zu einem Chloridtransporter bekannt, der bei der Kammerwasserproduktion im Auge relevant ist (64, 69).

Bei den beiden G_s -Protein gekoppelten Rezeptoren (A2AR und A2BR) kommt es über die α_s -Untereinheit des G-Proteins zunächst zur Steigerung der Aktivität der Adenylatcyclase und somit zur cAMP Erhöhung (19). Im A2B Rezeptor ist die G_s vermittelte Aktivierung von ERK1/2 von der Aktivierung von PI3K und daraufhin Rap1 abhängig, wohingegen der A2AR über die cAMP Erhöhung die Proteinkinase A (PKA) aktiviert und eine intrazelluläre Tyrosinkinase Src auslöst, die dann zur Aktivierung der MAPK Kaskade führt (19, 24). Neben der Aktivierung der MAPK Kaskade kann die Erhöhung der PKA auch zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB führen, welcher dadurch selbst aktiviert wird und in Kontakt mit verschiedenen Promotern die Genexpression starten kann (3, 70). Der A2A Rezeptor kann über die cAMP Steigerung auch direkt einen Faktor Epac aktivieren (3, 48). Jüngste Ergebnisse lassen vermuten, dass der Cofaktor C/EBPbeta verantwortlich ist für den stimulierenden Effekt von A2A Rezeptoren auf Makrophagen, die daraufhin IL-10 produzieren (3, 71). Man nimmt an, dass der A2A Rezeptor der wichtigste immunregulatorische Arm des Adenosinsystems ist und dass dieser Rezeptor stark anti-inflammatorisch in bestimmten Immunzellen, bei verschiedenen Entzündungen und in Geweben wirkt (43, 72–74). Dies unterstreichen auch pharmakologische Studien, die zeigten, dass die Signalweiterleitung über A2A Rezeptoren in neutrophilen Granulozyten im menschlichen Körper eine anti-inflammatorische Funktion hat

(64, 73, 75–77). Cronstein et al. behauptet sogar, dass über die cAMP Erhöhung neutrophile Leukozyten gehemmt werden (61). Man konnte auch bereits feststellen, dass Antagonisten für diesen Rezeptor bei Parkinson Erkrankungen einen therapeutischen Benefit zeigen (64, 78). Der A2BR mobilisiert neben der MAPK-Kaskaden Aktivierung, die zur Freisetzung von IL-8 und so zur Mastzellaktivierung führt, intrazelluläres Ca^{2+} (24). Dem A2B Rezeptor werden sowohl pro-inflammatorische als auch anti-inflammatorische Antworten zugeschrieben, je nach Grad der Entzündung und Gewebetyp. Jedoch bedarf es weiterer Untersuchungen, um die genauen Wirkungsweisen und Mechanismen dieses Rezeptors darstellen zu können (43, 79). A2B Rezeptoren scheinen eine Rolle bei der Gewebeadaptation in hypoxischem, entzündlichem oder ischämischem Gewebe zu spielen (64, 80–83) und einen Part in der Zellproliferation und -differenzierung zu bilden (24).

Interessanterweise sind die divergenten Subtypen der Adenosinrezeptoren auf verschiedenen Zellen unterschiedlich stark vertreten. A2B Rezeptoren findet man vermehrt auf Endothelzellen in Gefäßen (64, 84, 85). Auf Immunzellen wie neutrophilen Granulozyten (73) oder Lymphozyten (86) ist der A2A Rezeptor stärker repräsentiert (64).

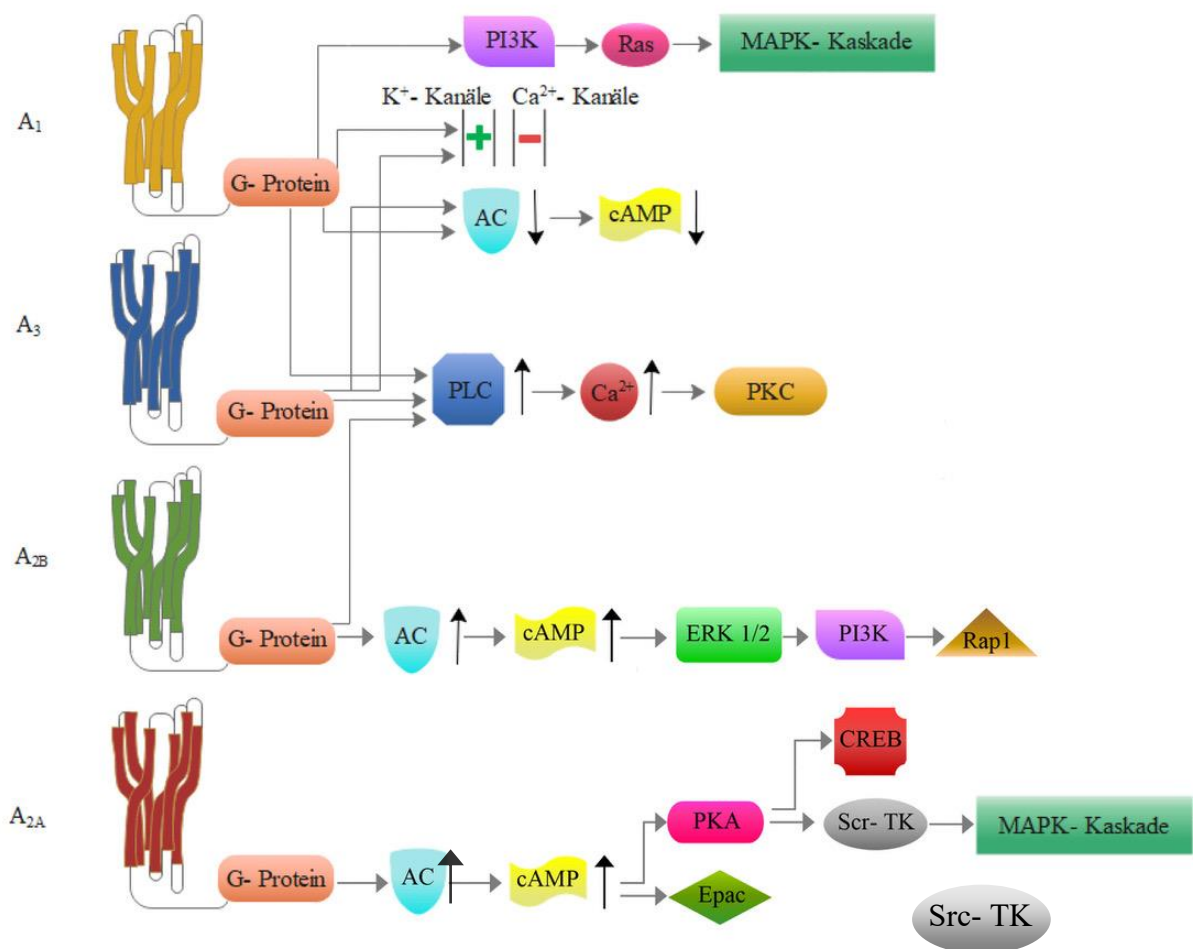


Abb. 1: Überblick über die vier verschiedenen Adenosinrezeptoren und ihre weitere Wirkung

Dargestellt sind die vier Adenosinrezeptoren A₁, A₃, A_{2B} und A_{2A} sowie ihre entsprechenden intrazellulären Signalkaskaden. Man unterscheidet den Signalweg über die Erhöhung/Senkung des cAMP über die

Adenylatcyclase oder den erst später entdeckten Signalweg über mitogen aktivierte Proteinkinasen (MAPK-Kaskade). PI3K = Phosphatidylinositol-3-Kinase; Ras = G-Protein Ras; K⁺-Kanäle = Kalium-Kanäle; Ca²⁺-Kanäle = Calcium-Kanäle; AC = Adenylatcyclase; cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat; PLC = Phospholipase C; PKC = Proteinkinase C; ERK1/2 = *extracellular signal-regulated kinases*; Rap1 = *Ras-related protein 1*; PKA = Proteinkinase A; CREB = *cAMP response element-binding protein*; Src-TK = *Sarcoma tyrosine-protein-kinase*; Epac = *exchange protein directly activated by cAMP*. + = aktiviert; - = inhibiert; ↑ = aktiviert/erhöht; ↓ = unterdrückt/senkt ab.

Insgesamt ist es wichtig zu berücksichtigen, dass der Effekt von Adenosin nicht nur durch die Konzentration beeinflusst wird, sondern auch die Dichte und Lokalisation der Rezeptoren, die unterschiedliche Affinität zum Liganden, die Funktionalität der intrazellulären Signalmoleküle und die Übertragung der Signale eine entscheidende Rolle spielen (3, 19, 24).

1.2.2 Die Adenosinkaskade

Extrazellulären Nukleotiden kommen wichtige Aufgaben in den unterschiedlichsten Gewebearten zu: Zellentwicklung, Blutfluss, Sekretion, Entzündung und Immunreaktionen sind Funktionen, welche sie beeinflussen (87). Schon lange ist man sich der Wichtigkeit der extrazellulären Nukleotide für die intrazelluläre Signalgebung bewusst (87–89). Hierfür trägt jede Zelle eines Säugetiers ionotrope (P2X) und metabotrope (P2Y) Rezeptoren, um Signale durch die Bindung der Nukleotide zu empfangen. Darüber hinaus kann auch jede Zelle selbst Nukleotide freisetzen (87). ATP und NAD⁺ werden von der Zelle freigesetzt als Reaktion auf Stoffwechselstörungen, Zelltod oder andere Notsignale im extrazellulären Raum (90–92). Extrazelluläres ATP und NAD⁺ werden durch eine purinerge Enzymkaskade auf der Zelloberfläche metabolisiert (93) (Abbildung 2). Es ist bekannt, dass diese purinerge Signalgebung die Funktion von Immunzellen regulieren kann, Einfluss auf die Wechselwirkungen zwischen Zellen hat, Zytokin- und Chemokin-Sekretion beeinflusst, Oberflächen-Antigen-Abstoßung modelliert, eine Wirkung auf die intrazelluläre Pathogenbekämpfung hat und die Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beeinflusst (3, 30, 33). Die in dieser Kaskade involvierten Enzyme werden auch Ektoenzyme genannt. Sie sind katalytische Proteine, die in die Oberflächenmembran einer Zelle integriert sind und ihre aktive Seite nach extrazellulär tragen (94). Meist handelt es sich um große Glykoproteine (95), die fest eingebaute Membranproteine vom Typ II sind, mit einer kurzen terminalen Amino-Domäne (zytoplasmatisch) und einer langen terminalen Carboxy-Domäne (katalytisch) (94, 96). Die Ektonukleotidasen bilden das Bindeglied zwischen den Zellen und ihrer unmittelbaren Umgebung, wie beispielsweise dem Immunsystem. Diese Bindung kann zu einer Änderung des Energiestatus der Zelle führen oder auch zur Aktivierung oder Unterdrückung von Leukozyten Aktivität. Die aufgezeigten Reaktionen werden zusätzlich von Adenosin und anderen Produkten der Ektoenzyme beeinflusst (97). Die Enzyme geben eine Antwort auf Hormone und Zytokine, beeinflussen benachbarte Zellen und deren Aktivität und haben somit Kontrolle über Wachstum, Differenzierung und Bewegung von Zellen (94, 98). Manche Ektoenzyme sind in sehr vielen unterschiedlichen Gewebearten vertreten, andere wiederum befinden sich nur in einem ganz speziellen Gewebe (94, 99, 100).

Die Adenosinkaskade weist zwei mögliche Wege zur Entstehung des Adenosins auf. Zum purinergen Signalweg gehören CD38 (Familie der NAD⁺-Glycohydrolasen), CD157 (Familie der NAD⁺-Glycohydrolasen), die alkalische Phosphatase (AP), CD39 (Familie der Nucleosidtriphosphat-Diphosphohydrolasen), CD203a und CD203c (Familie der Ektonukleotidpyrophosphatasen (ENPP)) und die Ecto-5'-Nukleotidase CD73. Über eine

Desaminase (ADA) und die Purinnucleosidphosphorylase (PNP) kann das entstandene Adenosin noch weiter abgebaut werden. Zuerst entdeckt wurde der Zweig des Signalwegs von ATP über ADP zu AMP, welcher durch das Enzym CD39 katalysiert wird. Schließlich erkannte man auch die Umwandlung von AMP zu Adenosin über das Enzym CD73 im extrazellulären Raum (97, 101, 102). Das Enzym CD73 (Ecto-5'-Nukleotidase) ist die einzige Ektonukleotidase, die diesen Schritt katalysiert, und stellt somit eines der Schlüsselenzyme dieser Kaskade dar – und dies sogar für beide möglichen Reaktionswege. Der große Unterschied zwischen der linken und der rechten Achse der Adenosinkaskade liegt darin, dass der Weg über NAD^+ unabhängig von CD39 ablaufen kann. Der alternative Weg läuft somit wie folgt ab: NAD^+ wird von CD38 zu ADP-Ribose hydrolysiert (direkt oder über einen zyklischen Zwischenschritt) (97, 103). Daraufhin kann CD203a ADP-Ribose zu AMP hydrolysieren. Interessant ist, dass CD203a auch NAD^+ direkt oder sogar ATP als Substrat verwenden kann (94, 97, 104, 105). CD203c und AP können auch ATP als Substrat zu AMP abbauen. Adenosin kann entweder an einen extrazellulären spezifischen P1 Rezeptor binden und über eine cAMP Steigerung eine Immunsuppression auslösen oder es wird durch ADA, welches an CD26 gebunden ist, inaktiviert und von der PNP über Inosin zu Hypoxanthin katalysiert (3, 30, 97). Des Weiteren kann es auch über einen Nucleosidtransporter in die Zelle aufgenommen werden (97, 106). Während ATP eher entzündungsfördernde Reaktionen hervorruft, zeigt Adenosin eher entzündungshemmende Wirkung (64, 107). Über einen negativen Feedbackmechanismus unterdrückt Adenosin eine verstärkte Aktivierung von Immunzellen (64, 97, 108).

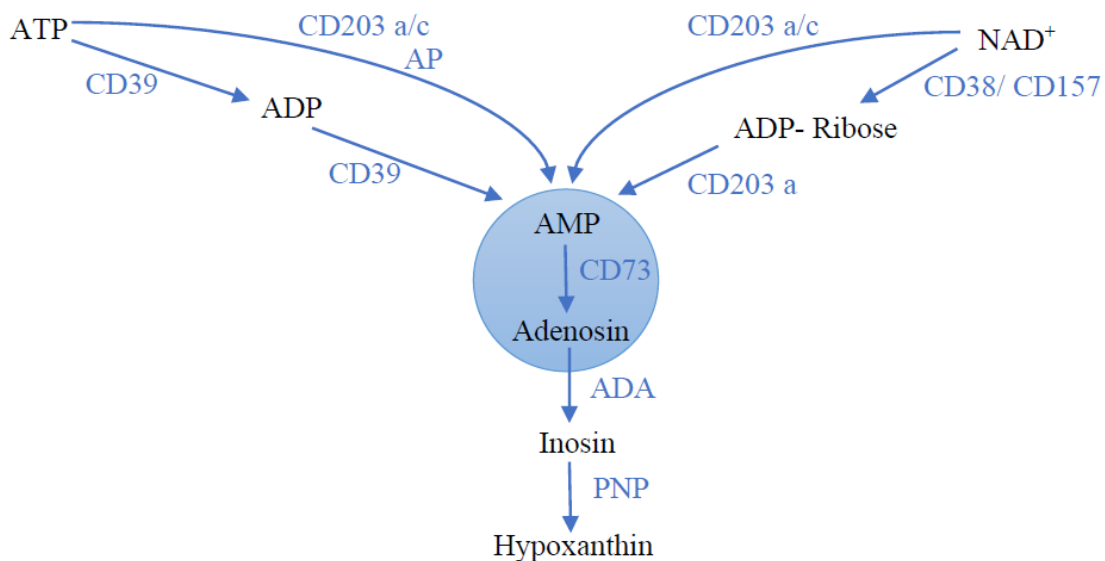


Abb. 2: Überblick über den Metabolismus von ATP und NAD^+ durch die purinerge Enzymkaskade

Extrazelluläres Adenosintriphosphat (ATP) kann durch die Ectonucleosidtriphosphat-Diphosphohydrolase CD39 (über Adenosindiphosphat (ADP)) in Adenosinmonophosphat (AMP) umgewandelt werden oder direkt über die alkalische Phosphatase (AP). Alternativ kann ATP auch über die Ecto-Nukleotidpyrophosphatasen CD203a und CD203c zu AMP abgebaut werden. Extrazelluläres Nicotinamidadeninucleotid (NAD^+) wird durch die NAD^+ -Glycohydrolasen CD38 und CD157 zu ADP-Ribose metabolisiert und dann über die Pyrophosphatase CD203a zu AMP abgebaut. NAD^+ kann auch direkt durch die Pyrophosphatasen CD203a und CD203c abgebaut werden. Die Ecto-5'-Nukleotidase CD73 wandelt AMP in Adenosin um, das von der Adenosindesaminase (ADA) zu Inosin und von der Purinnucleosidphosphorylase (PNP) zu Hypoxanthin abgebaut wird.

Vor 35 Jahren wurde erstmals die Hypothese aufgestellt, dass die purinerge Signalübertragung bei SLE in Bezug auf die Pathogenese der Erkrankung eine wichtige Rolle spielt: Es wurde berichtet, dass T-Zellen von SLE Patienten einen Defekt in ihrer durch Adenosin induzierten immunregulatorischen Aktivität besitzen, was dazu führte, dass B-Zell-Proliferation und Differenzierung nicht mehr unterdrückt werden konnten (109, 110). Dies konnte man später auf einen Defekt im cAMP abhängigen A₂ Rezeptor Signalweg in T-Zellen von SLE Patienten zurückführen (111). 1999 wurde über eine signifikant reduzierte CD73 Aktivität in T-Zellen und ein Trend zur verminderten CD73 Aktivität in B-Zellen berichtet (112). Daraufhin lag der Schluss nahe, dass eine reduzierte Adenosinbildungsrate an der Pathogenese des SLE beteiligt sein könnte (112). Auch ATP vermittelte pro-inflammatorische Signalübertragung über den P2X₇ Purinorezeptor, zusammenhängend mit einer Inflammasom Aktivierung, wurde mit der Pathogenese des SLE in Verbindung gebracht (113). Zuletzt stellte man eine Verknüpfung her zwischen der Hochregulation von A_{2A} Rezeptoren auf Lymphozyten und der Krankheitsaktivität des SLE. Somit scheint die pharmakologische Aktivierung des A_{2A} Rezeptors nützlich, um die Entzündung bei den Patienten zu verringern (114). B-Zellen weisen eine höhere Aktivität von ATP abbauenden und Adenosin erzeugenden Enzymen auf als T-Zellen (115). Jedoch sind der Metabolismus und der Signalweg von Adenosin bei B-Zellen und dessen Rolle in der Pathogenese des SLE bisher kaum beschrieben. Interessanterweise wird die Ekto-NAD⁺-Glycohydrolase CD38 stark auf B-Zellen exprimiert und scheint dort als Signalmolekül zu fungieren, doch auch hier ist die spezifische Rolle der enzymatischen Aktivität bei der Regulation der B-Zell-Funktion nicht geklärt (116).

1.2.2.1 CD39 und CD73

Im Abbau von extrazellulären Nukleotiden sind eine Vielzahl von an der Zelloberfläche lokalisierten Enzymen involviert. CD39 und CD73 werden als die beiden wichtigsten angesehen in Bezug auf Immunität und Entzündung (37, 107).

Acht verschiedene NTPD Gene existieren, die für Enzyme der Nucleosidtriphosphat-Diphosphohydrolase-Familie (NTPD) kodieren. Vier der acht identifizierten NTPDasen sind an der Zelloberfläche lokalisiert und zeigen mit ihrer katalytischen Bindungsseite nach extrazellulär (87). Man findet auch einige NTPDasen, die sich am Golgi Apparat befinden oder sogar löslich sind und somit keine Transmembrandomäne besitzen (94, 107, 117, 118). Mitte der Neunziger Jahre identifizierte man das erste Enzym der Familie, NTPDase 1 (CD39). Es gilt zu beachten, dass der Begriff CD39 (L1–4) nur für die NTPDase 1 (CD39) und für keine andere NTPDase verwendet wird (119). Humanes CD39 ist ein 510 Aminosäuren langes Protein mit sieben potentiellen N-Glykosylierungsstellen, 11 Cys Resten und zwei Transmembranregionen (107, 120). Strukturell ist es gekennzeichnet durch zwei Transmembrandomänen, eine kleine zytoplasmatische Domäne, die das NH₂- und COOH-Ende beinhaltet und eine große extrazelluläre hydrophobe Domäne bestehend aus fünf hochkonservierten Domänen, bekannt als Apyrase-konservierte Regionen (ACR) 1-5, die für die katabole Aktivität des Enzyms stehen (107, 121). Die Aminosäuresequenzen von ACR 1 und ACR 5 enthalten ein Phosphat-bindendes Motiv, das sich als kritisch für eine stabile Wechselwirkung zwischen dem Enzym und seinem Nukleotidsubstrat während der Phosphatspaltung erweist (107). Außerdem sind zwei ACR-Reste, Glu 174 in ACR 3 und Ser 218 in ACR 4 notwendig für die Enzymfunktion (107, 121, 122). CD39 wird an der

Zelloberfläche katalytisch aktiv und seine Glykosylierung ist entscheidend für eine korrekte Proteinfaltung, *Membran-Targeting* und die Enzymaktivität (107, 122).

CD39 (Ekto-Nukleosidtriphosphat-Diphosphohydrolase 1; ENTPDase 1) (87, 120, 123) ist ein in die Membran integriertes Protein, das hauptsächlich ATP zu AMP phosphohydrolysiert (107). Nicht ganz so effizient hydrolysiert das Enzym auch ADP zu AMP (107). Dabei ist es abhängig von seinen Cofaktoren Calcium und Magnesium (107, 121), sodass das Enzym inaktiv bleibt, wenn diese Cofaktoren nicht vorhanden sind (87). Erstmals entdeckte man CD39 auf durch Epstein Barr Virus veränderten B-Zellen, daraufhin auch auf aktiven B-Zellen, natürlichen Killerzellen (NK) und auf Untergruppen von aktiven T-Zellen (94, 124). Obwohl man CD39 früh als B-Lymphozyten Aktivitätsmarker identifizierte, ist bisher erst wenig bekannt über die humorale und zelluläre Immunantwort in diesem Zusammenhang (120, 123). Dwyer et al. bemerkten erste Hinweise, dass CD39 Einfluss auf die Reifung der Antikörper und deren Affinität hat (123).

CD39 wird konstitutiv in Milz, Thymus, Lunge und Plazenta exprimiert (107, 125–128): In diesen Organen ist es vor allem an Endothelzellen und Immunzellen, wie B-Zellen, natürlichen Killerzellen, dendritischen Zellen, Langerhans-Zellen, Monozyten, Makrophagen, mesangialen Zellen, neutrophilen Zellen und regulatorischen T-Zellen (Tregs) zu finden (107, 123, 129). Dwyer et al. fanden die meisten CD39 positiven Zellen im Pool der CD19 positiven B-Zellen (123). Die Expression von CD39 wird über unterschiedliche Wege reguliert: Mehrere entzündungsfördernde Zytokine, oxidativer Stress und Hypoxie (87, 107, 130–133) spielen eine Rolle, so wie die Transkriptionsfaktoren Sp1 (131), Stat3 und der Zinkfingerprotein-Wachstumsfaktor *Independent-1* (134). Zusätzlich wurde eine erhöhte Expression von CD39 in mehreren soliden Tumoren (Darmkrebs, Kopf-Hals-Krebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs), sowie bei der chronisch lymphatischen Leukämie gefunden, was darauf hindeutet, dass dieses Enzym auch an der Entwicklung und Progression von Malignomen beteiligt ist (107, 135). Anfangs hielt man CD39 für ein Antigen, welches Lymphozyten aktivieren kann, mit weiterer unbestimmter Funktion (87, 120). Inzwischen weiß man, dass die NTPDase 1 (CD39) wichtigste und meist vertretene Ektonukleotidase im Gefäßsystem ist und sich überwiegend auf den Endothelzellen oder den glatten Muskelzellen des Gefäßes befindet (87, 125). Die genaue biologische Aktivität von CD39 ist nicht gänzlich geklärt, aber man vermutet, dass das Enzym auf Gewebeverletzungen reagiert. Aufgrund der Expression auf dem Gefäßendothel gibt es Hinweise, dass CD39 eine Rolle bei der Blutgerinnung spielt und eine thromboregulatorische Aufgabe erfüllt (87, 136). Man kann CD39 durchaus als antithrombotisch ansehen, da es ADP abbaut, wodurch dieses als potenter Agonist der Thrombozytenaggregation über den P2 Purinorezeptor verringert wird (94, 136, 137). Sobald eine Endothelzelle aktiviert wird, gehen die antithrombotischen Effekte von CD39 verloren (136). Junger et al. zeigten außerdem, dass CD39 *knock out* Mäuse mehr und deutlich schwerere Entzündungen durch die verminderte ATP Hydrolyse, Adenosin Gewinnung und A2A Rezeptor Aktivierung entwickelten als der Wildtyp (30, 127).

Der zweite Schritt im Metabolismus der Purinnukleotiden wird durch das Enzym CD73 katalysiert (107). CD73 (Ekto-5'-Nukleotidase; Ekto-5'-NTase) ist ein Enzym aus der Gruppe der Nukleotidasen und seine Hauptaufgabe ist die Verwertung von Purinen, wie beispielsweise die Desphosphorylierung von AMP zu Adenosin und einem Phosphatrest (94, 107). Ohne diese

Reaktion können Nucleoside nicht recycelt werden und über spezifische Nucleosid Transporter nach intrazellulär diffundieren (94, 102). Einerseits beendet das Enzym mit dieser Reaktion die extrazelluläre Wirkung von Nucleotiden, in diesem Fall ATP, welches normalerweise an P2X und P2Y Rezeptoren binden und weitere Reaktionsketten auslösen würde. Andererseits entsteht Adenosin, welches selbst über einen P1 Rezeptor seine Wirkung ausüben kann (38, 102).

In Säugetieren wird CD73 durch nur ein einziges Gen dargestellt (94). Strukturell gehört CD73 zu den Metallophosphoesterasen mit einem zweikernigen metallischen Zentrum (102, 138). Es ist ein Dimer aus zwei identischen Untereinheiten, die über einen C-terminalen Serinrest (Ser 523), verbunden mit Glycosylphosphatidylinositol (GPI), ohne Membran eingebettete Proteinsegmente an der Plasmamembran verankert ist (102, 107, 139). Man kann eine lösliche Form von CD73 erhalten, indem man den GPI-Anker durch spezifische Phospholipasen proteolytisch spaltet oder hydrolysiert, sodass CD73 von der Membran freigegeben wird (37, 107, 140–142). Die reife Form von CD73 besteht aus 548 Aminosäuren mit einer geschätzten Molekülmasse von 61 kDa, umfassend ein 26 Aminosäuren langes Signalpeptid am N-Terminus und einer C-Terminus-Sequenz für die Anbringung an den vorgeformten GPI-Anker (107, 143). Die N-terminale Domäne koordiniert die Bindung von zwei katalytischen zweiwertigen Metallionen (Zn^{2+} und Co^{2+}), während die C-terminale Domäne die Bindungstasche für AMP bildet (102, 107). Fini et al. stellten erstmals fest, dass mindestens eine der Metallbindungsstellen mit Zink besetzt ist (102, 144). Interessanterweise wirken ADP und ATP als kompetitive Inhibitoren von CD73. Denn sie binden an die aktive Seite des Enzyms, können jedoch nicht selbst hydrolysiert werden (102, 107, 145). Neben der enzymatischen Funktion hat CD73 auch nicht enzymatische Funktionen wie die T-Zell-Aktivierung und Unterstützung des Zell-Zell-Kontakts (102, 146).

CD73 findet man auf einer Vielzahl verschiedener Gewebe: am Dickdarm, im Gehirn, an der Niere, an der Leber, in der Lunge, am Herzen, auf Leukozyten, die aus dem peripheren Blut stammen, in der Milz, in Lymphknoten, im Thymus, im Knochenmark und auf dem Endothel (107, 147, 148). Es gibt Hinweise, dass die Expression und die Funktion von CD73 hoch reguliert wird unter hypoxischen Bedingungen und unter Anwesenheit von verschiedenen pro-inflammatorischen Mediatoren wie *transforming growth factor β* (TGF- β), Interferonen (IFNs), Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), Interleukin 16 (IL-16) und Prostaglandin E2 (107, 149, 150). Es wurde auch eine Steigerung der CD73 bei mehreren neoplastischen Tumoren festgestellt (149), was darauf hindeutet, dass dieses Enzym auch an der Entstehung und Progression von Neoplasien beteiligt ist (107).

Expression und Aktivität der beiden Enzyme CD39 und CD73 sind stark davon abhängig, in welchem Zustand sie sich gerade befinden (107, 151). Daher wird vermutet, dass Veränderungen am purinergeren Signalweg die pathophysiologische Situation und das Ergebnis der Krankheit beeinflussen (Infektionen, AIDS, Autoimmunerkrankungen, Artherosklerose, Krebs und *ischemia reperfusion injury*) (107, 130, 135, 152–154). Dwyer et al. zeigten auch, dass eine koordinierte Regulation der Expression von CD39, CD73 und dem A2A Rezeptor eine immuninhibitorische Schleife aktiviert, die Th1 und Th2 Antworten auf unterschiedliche Weise reguliert (123).

CD39 und CD73 können als eine Art „Immunologischer Schalter“ angesehen werden, da sie durch den Abbau von ATP, ADP und AMP zu Adenosin die pro-inflammatorischen Signale

des ATPs blockieren und hin zum entzündungshemmenden Zustand – ausgelöst durch Adenosin – verschieben (43, 149, 107). Beide sind somit als wichtige immunregulatorische Enzyme einzuordnen (123).

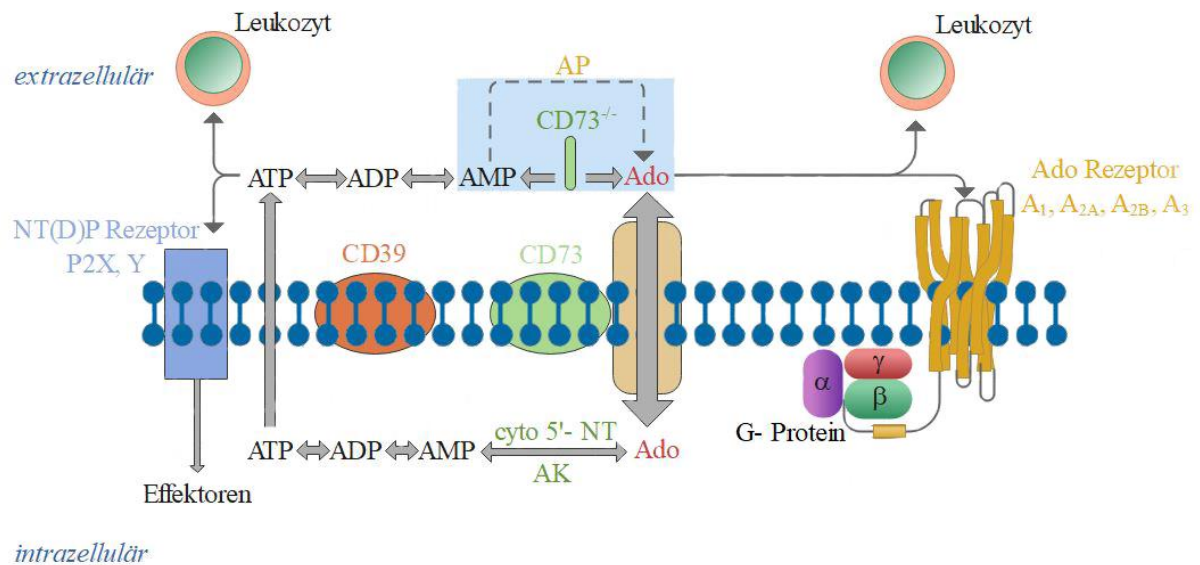


Abb. 3: Überblick über den Metabolismus von ATP zu Adenosin intra- und extrazellulär: Abbau und Rezeptoren.

Schematisch dargestellt ist der Abbau von Adenosintri-phosphat (ATP) über Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosinmonophosphat (AMP) zu Adenosin (Ado) sowohl intrazellulär als auch extrazellulär. Außerdem findet man CD73 als Ektoenzym, als zytosolisches Enzym (cyto 5'-NT) und als lösliches extrazelluläres Enzym (CD73^{-/-}), welches stets die Reaktion von AMP zu Ado katalysiert. Weitere dargestellte Enzyme: Ektoenzym CD39, das die Reaktion von ATP über ADP zu AMP katalysiert, extrazelluläre Alkalische Phosphatase (AP), die deutlich unspezifischer als CD73 auch im geringen Maße AMP zu Adenosin umwandeln kann und die Adenosinkinase (AK), die als Gegenspieler der CD73 Adenosin zu AMP katalysiert. Des Weiteren sind schematisch dargestellt der NT(D)P Rezeptor (Nukleotidtriphosphat(diphosphat) Rezeptor) mit P2X als ATP Rezeptor und P2Y hier als ADP Rezeptor. Die vier G-Protein gekoppelten Adenosinrezeptoren A1, A2A, A2B und A3 und ein bidirektionaler Adenosintransporter sind auch an der Zellmembran gezeigt.

1.2.2.2 Weitere Enzyme der Adenosinkaskade

1.2.2.2.1 CD203a / CD203c

Es gibt sieben Enzyme (NPP1–NPP7) in der NPP-Familie (Nukleotidpyrophosphatase-Familie) (155, 119). Hiervon sind drei Nukleotid hydrolysierende Enzyme relevant für den purinergen Zellsignalmechanismus: NPP 1 (PC-1 (Plasmazellglykoprotein 1) oder CD203a), NPP 2 (Autotaxin (ATX) oder Phosphodiesterase 1 α) und NPP 3 (CD203c) (119, 155–157). CD203a und CD203c sind strukturell sehr ähnlich, denn sie sind Membranproteine vom Typ 2 und bestehen aus drei Domänen, einer intrazellulären N-terminalen Domäne, einer Transmembrandomäne und einer extrazellulären Domäne. NPP 2 hingegen ist nicht membrangebunden und existiert nur in einer sezernierten Form (119). Die Ektonukleotidphosphodiesterasen (auch Ektonukleotidpyrophosphatase) CD203a und CD203c unterscheiden sich von den intrazellulären Phosphodiesterasen. Sie haben eine sehr breite Spezifität und können unter anderem Phosphodiester Verbindungen von Nukleotiden und Nukleinsäuren lösen oder Pyrophosphatverbindungen von Nukleotiden und Nukleotidzuckern auflösen (94, 87). Sie hydrolysieren ATP zu AMP und Pyrophosphat, katalysieren die Reaktion

von ADP zu AMP und Phosphat und die Reaktion von NAD^+ zu AMP und NAMN (*Nicotinamide mononucleotide*). CD203a, auch ENPP1 oder PC-1 genannt, hydrolysiert aus dieser Enzymfamilie ADP (94). Häufig werden sie in Zusammenhang mit den Adenin Nucleotiden gebracht, dabei können sie auch GTP (Guanosintriphosphat), TTP (Thymidintriphosphat), CTP (Cytidintriphosphat) und UTP (Uridintriphosphat) abbauen (94). Einige andere wichtige physiologische Prozesse im Zusammenhang mit den Enzymen dieser Familie neben der Mitwirkung der purinergen Signalkaskade sind Recycling von extrazellulären Nucleotiden, Regulierung der Pyrophosphat Spiegel und Zellmotilitätsaktivierung (119). Weitere vermutete Rollen sind die Beteiligung an der Insulinrezeptorsignalisierung und Modulation der Ektokinase-Aktivität (119, 158).

1.2.2.2.2 CD38

CD38, auch Ekto- NAD^+ -Glykohydrolase genannt, ist wie viele andere der Ektoenzyme auch ein Membranprotein Typ II und wird auf sehr vielen verschiedenen Zellen exprimiert, unter anderem auch auf B-Zellen (94). CD38 hat einen sehr kurzen zytoplasmatischen Rest und keine offensichtlichen Signalmotive (94). Auf welcher molekularen Basis das Enzym arbeitet, ist bisher unklar (94, 159). Man vermutet, dass CD38 und B-Zell-Rezeptoren einen extrazellulären Kommunikationsweg bilden, denn CD38 benötigt die Anwesenheit des B-Zell-Rezeptors mit Antigen, $\text{Ig}\alpha$ und $\text{Ig}\beta$ Kette (94). Die Aufgabe von CD38 in Bezug auf die purinerge Signalkaskade ist die Metabolisierung von extrazellulärem NAD^+ zu ADP-Ribose. CD38 wird häufig eingesetzt zur Identifizierung von Lymphozyten und deren Untergruppen (94). Interessanterweise unterscheidet sich das Expressionsmuster von CD38 auf den B-Zellen in einer Maus deutlich von dem im Menschen (94, 159): Auf den frühen B-Zellen in der Maus wird kaum CD38 exprimiert, wohingegen man auf den reiferen B-Zell-Stadien CD38 deutlich stärker exprimiert findet. In den Keimzentren, auf den Plasmazellen und auf B-Zellen, die bereits den Antikörper Isotypen geändert haben, findet man CD38 wiederum niedriger exprimiert (94). Beim Menschen findet man auf den unreifen B-Zellen gegenteilig hohe Anteile von CD 38, die während der B-Zell-Reifung aber deutlich abnehmen. Im Keimzentrum und auf den Plasmazellen findet man im Menschen wieder hohe Expressionsraten von CD38 (94).

1.2.2.2.3 Alkalische Phosphatase

Die alkalischen Phosphatasen gehören auch zur Familie der Ektonucleotidasen, die extrazelluläre Nucleotide zu Nucleosiden wie beispielsweise Adenosin hydrolysieren können (160, 161). Das Funktionsspektrum dieser Enzyme ist sehr weit: Sie sind substratunspezifische Enzyme, können viele Phosphomonoester hydrolysieren und spielen außerdem eine Rolle bei bestimmten Transphosphorylierungsreaktionen (160, 162, 163). Darüber hinaus sind die alkalischen Phosphatasen dafür bekannt, phosphathaltige Verbindungen zu hydrolysieren (160, 161). Für die Adenosinkaskade ist die Katalysation des ATPs zu AMP als die Hauptaufgabe der alkalischen Phosphatase zu betrachten. Jedoch konnte für diese Aufgabe bislang nicht der Beweis erbracht werden (119, 160).

APs können in zwei Gruppen unterteilt werden, zum einen die gewebeunspezifische alkalische Phosphatase (TNAP) und zum anderen die gewebespezifischen alkalischen Phosphatasen. Die gewebespezifischen alkalischen Phosphatasen lassen sich nochmals in drei verschiedene Arten unterteilen: die plazentale alkalische Phosphatase (PLAP), die intestinale alkalische Phosphatase (IAP) und die alkalische Phosphatase der Keimzelle (GCAP) (160, 161, 164). Die

alkalischen Phosphatasen findet man auf allen Zellen, jedoch ist die genaue physiologische Funktion der AP Isoenzyme bis auf die der TNAP schwer zu erfassen. AP befindet sich auf der Oberfläche von Plasmamembranen oder sekretorischen Vesikeln und wird über Glykosylphosphatidyl-Inositol-Verbindungen (GPI) an der Zelloberfläche verankert (160, 165). Bekannt sind sie für ihre Aufgabe bei der Osteoblasten- und Adipozytendifferenzierung (160, 166, 167). Der genaue Mechanismus, durch den AP die Adipogenese beeinflusst, ist jedoch nicht bekannt. Es gibt Hinweise auf eine direkte Verbindung zwischen der Aktivität des Enzyms und der Lipidakkumulation: Erhöhte AP-Aktivität wurde parallel zur Zunahme der Fettansammlung im abdominalen subkutanen Fettgewebe nachgewiesen (160, 168). Auf der Grundlage dieser Beweise postuliert man, dass die Messung der AP-Aktivität eine schnellere und empfindlichere Technik für die Quantifizierung der intrazellulären Lipidakkumulation sein kann als die bisher gängigen Methoden (160, 169). Die Rolle von TNAP bei der Fettansammlung wurde durch die Untersuchung von TNAP-*knockout*-Mäusen, bei denen ein schwerer Mangel an angesammeltem Fett beobachtet wurde, weiter unterstrichen (160, 170). Es wurden erhöhte Konzentrationen von TNAP im entzündeten Dickdarm von Ratten festgestellt. Darüber hinaus wurden Dickdarmzellen und infiltrierte Leukozyten entdeckt, die für diesen AP-Anstieg verantwortlich sein sollen. Hier wurde die alkalische Phosphatase als ein therapeutisches Ziel bereits angedacht (160, 171, 172).

1.2.2.2.4 CD157

CD157, bekannt unter BST-1 (*bone marrow stromal cell antigen 1*), gehört auch zu den Ektoenzymen und hat eine große Ähnlichkeit zu CD38. Bis zu 33% stimmen die Aminosäuresequenzen der Enzyme überein, allerdings ist CD157 über einen GPI-Anker mit der Membran verbunden und CD38 über ein Membranprotein vom Typ 2 (173). Trotzdem vermutet man, dass CD157 eine ähnliche enzymatische Aktivität wie CD38 haben könnte (173). Hirata et al. konnten erstmals in einer CHO-Zellreihe zeigen, dass CD157 eine ADP Ribosyl Cyclase Aktivität besitzt sowie eine cADPR Hydrolase Aktivität (174). Somit spaltet es extrazelluläres NAD⁺ und generiert cyclische ADP-Ribose und ADP-Ribose (175, 176). Dies sind die entscheidenden Aktivitäten des CD157 in Bezug auf die Adenosinkaskade (Abbildung 2). Die hydrolytische Aktivität der CD157 ist allerdings geringer als die von CD38 (175, 177). Man vermutet, dass CD157 für seine enzymatische Aktivität ein Metallion benötigt: Zink und Mangan konnten die Enzymaktivität steigern, wohingegen Kupfer sie inhibierte (174). Die Wirkungsweise dieses Enzyms war anfänglich unklar, bis auf die Tatsache, dass es eine wichtige Rolle im Wachstum der B-Lymphozyten spielt (173, 174). Man weiß inzwischen auch, dass CD157 neben der enzymatischen Funktion als eine Art Rezeptor fungieren kann (177). Es überwindet seine strukturellen Limitationen (GPI-Anker), tritt somit mit anderen Transmembranmolekülen in Kontakt und erlangt die Möglichkeit Signale weiterzugeben (175, 177). Dadurch ist es ein wichtiges Element bei der Kontrolle der Adhäsion, Migration und Diapedese von Leukozyten (177–179). Ferner spielt CD157 auch eine wichtige Rolle in der Homöostase von Ca²⁺ (176, 177). Man vermutet, dass die CD157 Expression hochreguliert wird, wenn ein DNA-Schaden stattgefunden hat und Entzündungen und Infektionen auftreten. Dies erklärt auch die vermehrte Expression von CD157 bei Patienten mit rheumatoider Arthritis im Vergleich zu gesunden Kontrollen (173, 177, 180).

CD157 wird auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert, neben Bindegewebszellen und Endothelzellen der Umbilikalvene (173) auch auf myeloischen Zellen der PBMCs, auf vielen

dendritischen Zellen (181), auf Fibroblasten der Haut, auf Mastzellen und auf peritonealen mesothelialen Zellen (182–186). Hirata et al. fanden außerdem mRNA von CD157 in der Plazenta, Lunge, Leber und den Nieren (174).

1.2.2.2.5 Adenosin-Desaminase

Die Adenosin-Desaminase katalysiert im purinergen Signalweg die Reaktion von Adenosin zu Inosin und Ammoniak in Form einer irreversiblen hydrolytischen Desaminierung (187). Im Menschen existieren verschiedenste Formen des Enzyms. Es handelt sich dabei um drei lösliche Formen (*large*, *intermediate* und *small*), die sich ineinander überführen lassen (187). Die *large* Form findet man vor allem in der Lunge und der Niere, hier jedoch nur mit einer niedrigen enzymatischen Aktivität. In Milz, Magen und Duodenum findet man vermehrt die *small* Form von ADA, welches hier eine hohe Enzymaktivität aufweist (187). Über CD26 kann ADA beispielsweise auf der Oberfläche von T-Lymphozyten binden (188). ADA ist ein allosterischer Effektor und verstärkt die Wirkung von Agonisten und Antagonisten am A1 Rezeptor (189). Herrera et al. fanden heraus, dass ADA nicht nur an den A1, sondern auch an den A2B Rezeptor bindet (189, 190). Diese Interaktion ist wichtig, da ADA so die Signaltransduktion und die Unempfindlichkeit des jeweiligen Rezeptors regulieren kann (188, 189, 191). Außerdem erleichtert es die Bindung der Liganden (189, 192, 193). Zwei Mitglieder der ADA Familie, ADA1 und ADA2, findet man als Ektoenzyme auf der Zelloberfläche von Leukozyten (30, 188, 194–197). Beide sind wichtig für Zytokinausschüttung und T-Zell-Proliferation (30, 198, 199). Ein Defekt im ADA Gen führt zu einem nicht funktionsfähigen Enzym und verursacht die Erkrankung *severe combined immunodeficiency disease (SCID)*. Mit Schäden bei der B- und T-Zellentwicklung und einer Gefahr vermehrter Infektionen durch massive A2A Rezeptor Aktivierungen ist bei dieser Erkrankung zu rechnen (30, 198, 200, 201).

1.2.2.2.6 Purin-Nukleosid-Phosphorylase

Die Purin-Nukleosid-Phosphorylase (PNP), die den letzten Schritt der Adenosinkaskade katalysiert, findet man in sehr vielen Gewebearten. Besonders hohe Level des Enzyms befinden sich jedoch in Lymphozyten (202, 203). Es katalysiert die Reaktion von Purinnukleosiden und Desoxynukleosiden zurück zu deren Purinbase und Ribose-1-Phosphat (202). Mit Blick auf die Adenosinkaskade wandelt es Inosin über eine Phosphorylierung zu Hypoxanthin und Ribose-1-Phosphat um (202, 203). Normalerweise steht diese Reaktion im Gleichgewicht mit der Phosphorylierung. Ist PNP defekt, entsteht vermehrt desoxy-GTP (dGTP) über die vermehrte Phosphorylierung von Desoxyguanosin. Das vermehrt anfallende dGTP führt zur Unterdrückung der DNA Synthese und Zellteilung, da dGTP ein potenter Inhibitor der menschlichen Ribonukleotid Reduktase in den Mitochondrien ist (202, 204). Ein PNP Mangel ist eine seltene autosomal rezessiv vererbte Erkrankung. Bei betroffenen Patienten zeigten sich nicht nur Fehler im Immunsystem auf B-Zell- und T-Zell-Ebene (12, 202, 203, 205, 206), sondern ein Drittel der Patienten zeigten auch autoimmune Ereignisse wie beispielsweise die Autoimmunkrankheit Lupus erythematodes (202–204).

1.3 Zusammenhang zwischen Adenosin und Immunsystem

1.3.1 Immunsystem im Allgemeinen

Unterschiedliche Zellen und Moleküle unseres Körpers bilden zusammen das Immunsystem, welches uns vor Infektionskrankheiten oder anderen schädlichen Substanzen schützen soll

(207). Traditionell wird zwischen dem angeborenen, unspezifischen Immunsystem, welches sofort gegen eindringende Krankheitserreger kämpft und dem adaptiven, humoralen Immunsystem unterschieden, wobei sich das humorale Immunsystem zunächst einmal mit dem Antigen auseinandersetzen muss. Letzteres setzt dementsprechend auch erst ein wenig verzögert ein. Ein Zusammenspiel des angeborenen und des adaptiven Immunsystems führt zu einer passenden Immunantwort gegen schädliche Substanzen (207). Die Immunantwort unseres Körpers kann in vier verschiedene Komponenten aufgeteilt werden: Erstens muss ein Krankheitserreger erkannt werden (207). Hierfür sind größtenteils die weißen Blutzellen des Körpers (Leukozyten), die eine schnelle sofortige Immunantwort auslösen, und die Lymphozyten, die dem adaptiven Immunsystem zugehören, zuständig (207). Zweitens muss die Infektion eingedämmt werden und letzten Endes vollständig abgewehrt werden (207). Hier greifen verschiedenste Immuneffektorfunktionen, wie das Komplementsystem der Blutproteine, die Antikörper und verschiedene weiße Blutzellen, zusammen (207). Einerseits ist es wichtig, dass die Infektion vollständig bekämpft wird, andererseits muss sich das Immunsystem dabei in seiner Immunantwort gut selbst regulieren, damit es nicht zu falschen Immunantworten und somit zu Allergien und Autoimmunkrankheiten kommt (207). Die letzte Komponente entspricht dem immunologischen Gedächtnis des adaptiven Immunsystems (207). Dies beinhaltet die Fähigkeit, bei einem Zweitkontakt mit demselben Erreger eine sofortige und stärkere Immunreaktion zu zeigen (207).

	Humoral	Zellulär
Angeboren	Zytokine/ Chemokine Komplementsystem	Monozyten/ Makrophagen Granulozyten Natürliche Killerzellen
Adaptativ	Immunglobuline	B-Zellen T-Zellen

Tabelle 1: Wichtige Bestandteile unseres Immunsystems kurz zusammengefasst

1.3.2 B-Zellen und ihre Rolle im Immunsystem

Die aus einer gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle des Knochenmarks stammenden B-Lymphozyten spielen bei der adaptiven Immunantwort im Zusammenspiel mit den T-Zellen und den natürlichen Killerzellen eine entscheidende Rolle (207). Erst im Lymphknoten reifen die naiven B-Zellen heran und unterziehen sich im Keimzentrum des Lymphknotens dem Prozess der produktiven Genumordnung, der somatischen Hypermutation und der Selektion nach der Antigenaffinität (1). Diverse Kontrollpunkte dienen dazu, autoreaktive B-Zellen auszusortieren, sodass die gereiften B-Zellen schließlich das Keimzentrum mit einer jeweils spezifischen Variante eines Antigenrezeptorprototyps an der Zelloberfläche, dem sogenannten B-Zell-Rezeptor (BCR), verlassen (207). Mithilfe des BCR erkennen die B-Zellen fremde im Körper zirkulierende Antigene (Ag) (207). Durch die Vielfalt des BCR ist eine spezifische Bindung und Erkennung eines fremden Antigens immer möglich (207). Solange sich kein fremdes Antigen im Körper befindet, kreist die B-Zelle als naiver Lymphozyt durch die Blutstrom- und Lymphbahn (207). Kommt es zu einem spezifischen Ag-BCR-Kontakt differenziert und proliferiert sie und wird zu einem Effektorlymphozyt, der sogenannten Plasmazelle (207). Diese Form kann nun die Antikörper sezernieren, die die spezifischen

Antigene des Krankheitserregers erkennen können (207). Meist jedoch können die B-Zellen nicht ohne die Hilfe der T-Zellen aktiviert werden (207). Die T-Zellaktivierung erfolgt beispielsweise über antigenpräsentierende dendritische Zellen, die zuvor Bestandteile des Krankheitserregers aufnehmen, fragmentieren, an der Zelloberfläche präsentieren und so in periphere lymphatische Gewebe wandern (207). Hier werden sie dann durch ihre Präsentation von den T-Zell-Rezeptoren (TCR) auf der T-Zelle erkannt und senden zusätzlich Costimuli wie Zytokine aus, die für die Aktivierung wichtig sind (207). Bei der naiven B-Zelle ist genau dieser Costimulus, der von der T-Zelle ausgeht, neben der Bindung des Antigens an den BCR relevant, um die B-Zelle richtig zu aktivieren, sodass sie zur Plasmazelle differenzieren kann (207). Festzuhalten ist, dass neben der Antigenpräsentation costimulierende Moleküle eine wichtige Rolle spielen für die adaptive Immunantwort (207). Darüber hinaus kann die naive B-Zelle selbst auch als Antigenpräsentierende Zelle für eine T-Zelle fungieren (207). Die Lebensdauer der B-Zellen lässt sich wie folgt eingrenzen: Etwa 85% der peripheren B-Zellen sind phänotypisch reif und haben eine Halbwertszeit von 5-6 Wochen, während der Rest mit einer Lebensdauer von mehreren Tagen kurzlebig ist (208). Insgesamt ist die Rolle der B-Zelle durch die Antigenpräsentation, die Costimulation der T-Zelle bis hin zur Zytokin- und Antikörperproduktion im Immunsystem sehr vielfältig (1).

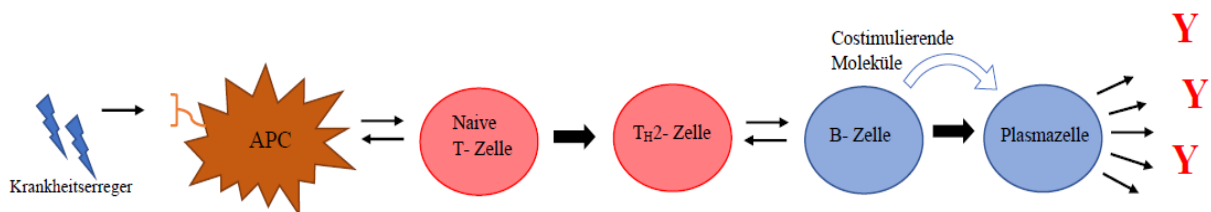


Abb. 4: Schematische Darstellung vom Krankheitserreger bis zur Antikörper-sezernierenden Plasmazelle.

Die antigenpräsentierende Zelle (APC) (z.B. Dendritische Zelle oder auch B-Zelle) nimmt den Erreger auf und präsentiert ihn an der Zelloberfläche. Die naive T-Zelle mit ihrem Rezeptor erkennt Teile des präsentierten Erregers und wird durch die Bindung aktiviert und zur T_{H2} -Zelle (Typ 2 T-Helferzelle). Durch die Interaktion von aktivierter T-Zelle und B-Zelle über den B-Zellrezeptor und costimulierende Moleküle, kann die B-Zelle zur antikörpersezernierenden Plasmazelle werden. Y= Antikörper

Beim SLE kann man die B-Zellen in drei Gruppen einteilen: die pathologischen autoreaktiven B-Zellen, die eine wichtige Rolle bei der Immunantwort spielen, die protektiven B-Zellen, die gegen pathogene Mikroorganismen schützen sollen und die regulatorischen B-Zellen, die das immunologische Gleichgewicht und die Selbsttoleranz aufrechterhalten (1).

1.3.3 B-Zellsubpopulationen

Wie in Abschnitt 1.3.2 bereits beschrieben, durchläuft eine B-Zelle verschiedene Reifestadien. Dementsprechend sind im menschlichen Körper stets B-Zellen in unterschiedlichen Reifestadien und mit unterschiedlichen Aufgaben anzutreffen. In den Keimzentren kommt es zur Antigen-spezifischen Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen (209–213). Dort durchlaufen die naiven B-Zellen verschiedene Aktivierungsprozesse: sie proliferieren, die somatische Hypermutation findet statt, Ig-Isotyp-*Switching* läuft ab und die nachfolgende positive und negative Selektion durch Antigene wird abgewickelt (210, 212, 214–216). Aktivierte B-Zellen reifen zu Plasmazellen heran und können damit Antikörper produzieren oder werden alternativ zu B-Gedächtniszellen (*memory b cells*) (2). Diese zweiteilige Entwicklung der B-Zellen wird durch die differentielle Expression einer Vielzahl von B-Zell-

Oberflächen-Antigenen, wie Oberflächen-Ig, CD38, CD20 und CD138 ermöglicht (211, 217). In den letzten Jahren standen die T-Zellen häufig im Mittelpunkt vieler Betrachtungen in Bezug auf die Autoimmunität, da sie in den meisten Geweben vorkommen, die vom Körper selbst angegriffen werden (13). Das Augenmerk wurde in letzter Zeit wieder verstärkt auf die B-Zellen gerichtet, da Therapieversuche gegen die T-Zellen nicht so erfolgreich wie gewünscht ausfielen (218, 219). Man entdeckte Neues im Bereich des Aktivierungsmechanismus, der Genetik in der Autoimmunität und der Verwendung B-Zell-depletierender Therapie (13). Inzwischen ist bekannt, dass es deutliche Unregelmäßigkeiten in den B-Zell-Kompartiments bei SLE Patienten gibt und diese daher auch unterschiedlich auf immunsuppressive Therapie reagieren (2).

1.4 Ziele der Arbeit

Der anti-inflammatorische Stellenwert des Adenosins ist bereits umfassend in Abschnitt 1.2 ausgeführt worden. Die grundlegende Idee dieser Arbeit besteht darin, die beim humanen SLE weitestgehend unerforschte Adenosinkaskade im Vergleich zu gesunden Kontrollen speziell auf B-Zellen zu untersuchen. Dabei sollen zum einen mittels quantitativer Echtzeit-PCR die verschiedenen Enzyme und Adenosinrezeptoren (CD38, CD39, ADA, CD203a, CD203c, CD157, CD73, Adenosinrezeptor 1, 2_A, 2_B, 3) bei SLE Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden identifiziert und zum anderen deren Expression auf B-Zellen verglichen werden.

Aus Vorversuchen bezüglich der Verteilung von CD73 in den Subpopulationen schlossen wir, dass sich die Adenosin-Enzym-Kaskade und die Adenosinrezeptorexpression bei den SLE Patienten und den gesunden Patienten unterscheiden (unpublizierte Daten), um perspektivisch etwaige weitere therapeutische Ansätze in der SLE Therapie zu finden und den Weg für neue Behandlungsmethoden zu bahnen.

2 Materialliste

Blutgewinnung

Bezeichnung	Hersteller	Sitz des Herstellers
BD Vacutainer K2E (EDTA)	Becton, Dickinson and Company	Franklin Lakes, NJ, USA
BD Vacutainer Safety-Lok	Becton, Dickinson and Company	Franklin Lakes, NJ, USA
21G-Butterfly	ICU Medical Germany GmbH	Lüdenscheid, Deutschland
Clearly Safe DuraPorter	Heathrow Scientific LLC	Vernon Hills, IL, USA

Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller	Sitz des Herstellers
15ml Röhrchen ohne Boden	Sigma Aldrich by Merck	Sigma Aldrich by Merck
50ml Blue Max Röhrchen ohne Boden	Becton & Dickinson Labware	Franklin Lakes, NJ, USA
50ml Cellstar Röhrchen mit Boden	Sigma Aldrich by Merck	Sigma Aldrich by Merck
8er-Streifen	Nippon Genetics	Tokyo/Kyoto, Japan
96 well plates round bottom Greiner Cellstar	Sigma Aldrich by Merck	St. Louis, MO, USA
Costar Stripette (25ml, 10ml, 5ml, 2ml)	Corning	Corning, NY, USA
Leucosep-Röhrchen 50ml	Sigma Aldrich by Merck	St. Louis, MO, USA
MS Säulen	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
LS Säulen	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Pasteurpipette (Natron-Kalk-Glas) 225mm	Brand	Wertheim, Deutschland
Preseparation Filter 30�m	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Safe-lock-Röhrchen 1,5ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Safe-lock-Röhrchen 2ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen TipOne	Starlab International GmbH	Hamburg, Deutschland
Combitips advanced 1,0ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

Medium und Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller	Sitz des Herstellers
Ampuwa (Steriles Wasser)	Fresenius Kabi Deutschland	Bad Homburg, Deutschland
Lymphoprep	Axis Shield PoC AS	Oslo, Norway
Macs Quant Running Buffer mit BSA	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Macs Quant Running Buffer ohne BSA	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Medium (RPMI 1640 mit Hepes 25mM)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Pan B-Cell Isolation Kit 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
Propidiumiodide Staining Solution	Becton, Dickinson and Company	Franklin Lakes, NJ, USA
Red Blood Cell Lysis Solution (10x)	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland

Durchflusszytometrie (FACS)

Bezeichnung	Klon	Konjugat	Verdünnung	Hersteller	Herstellersitz
CD39	MZ18-23C8	Vio-Blue	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
CD203a	Human ENPP-1 Alexa Fluor® 488 -conjugated Antibody	FITC		R&D Systems	Minneapolis, U.S.A.
CD38	IB6	PE	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
CD73	AD2	PE-Vio770	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
CD203c	FR3- 16A11	APC	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
CD157	REA465	APCVio770	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
CD19	LT19	Vio-Blue	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
CD23	M-L23.4	FITC	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-IgM	PJ2-22H3	PE	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
CD5	UCHT2	PE-Vio770	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
CD24	32D12	PerCP	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
CD1d	51.1	APC	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
CD11c	MJ4-27G12	APCVio770	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
CD138	44F9	Vio-Blue	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
CD38	REA671	PE	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland

CD73	AD2	PE-Vio770	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
CD21	HB5	PerCP	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-IgD	IgD26	APC	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
CD27	M-T271	APCVio770	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Mouse IgG1	IS5-21F5	Vio-Blue	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Mouse IgG1	IS5-21F5	FITC	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Mouse IgG1	IS5-21F6	PE	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Mouse IgG1	IS5-21F7	PerCP	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Mouse IgG1	IS5-21F5	PE-Vio770	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Mouse IgG1	IS5-21F5	APC	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Mouse IgG1	IS5-21F5	APCVio770	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
REA Control (S)	REA293	PE	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
REA Control (S)	REA293	APCVio770	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Mouse IgG2b	S43.10	APC	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Mouse IgG2b	S43.10	APCVio770	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Sheep IgG	Sheep IgG Alexa Fluor® 488 -conjugated Antibody	FITC		R&D Systems	Minneapolis, U.S.A.

FcR Blocking Reagent	-	-	01:05	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Propidium-Jodid	-	-	0,111111111	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland

RNA Isolation und cDNA

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
RNEasy Micro Kit	Qiagen	Venlo, Niederlande; Hilden, Deutschland
iScript gDNA Clear cDNA Synthesis Kit	BioRad	Hercules, California, U.S.A.
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen	Venlo, Niederlande; Hilden, Deutschland
Rnase- Free DNase Set	Qiagen	Venlo, Niederlande; Hilden, Deutschland
QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (25ml)	Qiagen	Venlo, Niederlande; Hilden, Deutschland

Geräte

Bezeichnung	Geräte-/Software name	Hersteller	Herstellersitz
Absaugsystem	Aspirator with trap flask	Kisker Biotech	Steinfurt, Deutschland
Autoklav	Systec VX-55	Systec	Linden, Deutschland
Durchflusszytometrie	MACS- Quant Analyzer 10	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, 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 no frost (4°C)	Liebherr	Biberach an der Riß, Deutschland

Multikanal-Pipette	Transferpipette-8 (50-200µl)	Brand	Wertheim, Deutschland
Multipipette M4		Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Multikanal-Pipette	Xplorer (50-1200µl)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
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
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5417 R	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415 C	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Zentrifuge	ROTINA 420 R	Hettich Zentrifugen	Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge	Himac CT 15 RE VWR	Hitachi Koki Co., Ltd.	Tokio, Japan
Nanophotometer	Nanophotometer P330	IMPLEN	München, Deutschland
PCR 96X universal	PEQ Star Lab	VWR	Wien, Österreich
Sicherheitswerkbank Herasafe		Heraeus Med GmbH	Meerbusch, Deutschland
Wasserbad		Köttermann	Uetze/Hänigsen, Deutschland

3 Methoden

Alle in den Methoden verwendeten Materialien wurden nach Herstellerangaben getreu verwendet.

3.1 Blutgewinnung

Für die Studie wurden insgesamt 30 Patienten, die nach den Kriterien des *American College of Rheumatology* an einem Systemischen Lupus Erythematoses erkrankt sind (220, 221), untersucht und in die Studie aufgenommen.

Die Blutabnahme (ca. 30ml EDTA Blut) erfolgte während einer ambulanten Routinevorstellung in der rheumatologischen Ambulanz im Universitätsklinikum Düsseldorf (Moorenstraße 5, 40225 Düsseldorf). Zuvor wurden die Patienten über das Projekt und dessen Ziele aufgeklärt und gaben schriftlich ihr Einverständnis ab. Ausgeschlossen aus der Studie wurden die Probanden, die kein Einverständnis erteilten, die minderjährig waren oder in den letzten 6 Monaten eine B-Zell-supprimierende Therapie (z.B. in Form von Rituximab, Belimumab oder Cyclophosphamid) erhalten hatten.

Die Blutabnahme wurde mittels einer *Vacutainer Safety-Lok-Butterfly*-Kanüle durchgeführt. Das entnommene Blut wurde dann schnellstmöglich in einer Transportbox (*Clearly Safe DuraPorter Sample Carrier* von Heathrow Scientific LLC, Vernon Hills, IL, USA) von der Ambulanz zum Hiller Forschungszentrum (im Life Science Center, Merowingerplatz 1a, 40225 Düsseldorf) transportiert und dort umgehend weiterverarbeitet.

Für die 22 gesunden Kontrollen wurden *Buffy Coats* von der Blutspendezentrale des Universitätsklinikums kommerziell erworben. Vor der eigentlichen Spende stimmten die Spender einer anonymisierten Verwendung ihres Blutes zu Forschungszwecken zu.

3.2 B-Zell-Separation

3.2.1 Methode

Das EDTA Blut wurde unter sterilen Bedingungen in einem 50ml Röhrchen zusammengeführt. Zur Separation der B-Zellen aus dem peripheren Blut wurde Lymphoprep (Axis Shield PoC A in Oslo, Norway) verwendet. Lymphoprep ist ein Dichtegradientenmedium, das für die Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut, Nabelschnurblut und Knochenmark empfohlen wird, und in dem Unterschiede in der Zelldichte ausgenutzt werden. Granulozyten und Erythrozyten haben eine höhere Dichte als mononukleäre Zellen und sedimentieren daher während der Zentrifugation durch die Lymphoprep Schicht. Mithilfe dieses Mediums und der Dichtegradienten-Zentrifugation konnte man die verschiedenen peripheren mononuklearen Zellreihen (PBMCs) zunächst voneinander auftrennen. Diese konnten dann von den restlichen Zellen abgenommen werden.

Die immunmagnetische Zelltrennung basiert auf Antikörpern, die an magnetische *Beads* gekoppelt sind. Während der Inkubation mit einer Zellsuspension bindet der Antikörper-*Bead*-Komplex an diejenigen Zellen, die das entsprechende Epitop exprimieren. Wird die Zellsuspension in ein Magnetfeld eingebracht, bleiben die magnetisch beschriftete Zellen erhalten, während die nicht beschrifteten Zellen aufgefangen werden können. Im Folgenden wurden alle Nicht-B-Zellen mit monoklonalen biotinylierten Antikörpern (gegen CD2, CD3, CD4, CD14, CD15, CD16, CD34, CD56, CD61, CD235a (Glycophorin A) und FcεRIα) markiert. Daraufhin wurden magnetische *Beads* zur Zellsuspension hinzugegeben, die an das Biotin der Antikörper banden. Die Zellsuspension wurde dann über eine Säule gegeben, die zuvor in einem starken magnetischen Feld eingebracht worden ist. Nach mehrmaligem Spülen mit MACS-Puffer verblieben die magnetisch markierten Nicht-B-Zellen in der Säule und im Überstand die B-Zellpopulation.

Es wurden ausschließlich Reagenzien von der Firma Miltenyi Biotec gemäß dem Hersteller-Protokoll verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank durchgeführt.

3.2.2 Durchführung MACS (*Magnetic Cell Sorting*) Separation

Zunächst wurde das Blut aus den EDTA Röhrchen in einem 50ml Falcon Röhrchen zusammengeführt (meist ca. 15ml insgesamt). Das Falcon Röhrchen mit dem Patientenblut wurde dann bis auf 30ml mit PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) aufgefüllt.

Ein Leukosep Röhrchen (Sigma Aldrich by Merck in St. Louis, MO, USA), welches mit einer speziellen Membran versehen ist, wurde mit 15ml Lymphoprep befüllt und anschließend bei Raumtemperatur für 30 Sekunden auf 1000g zentrifugiert. Durch die Zentrifugation sammelte sich das Lymphoprep unterhalb der Membran. Daraufhin wurde das Gemisch aus Blut und PBS in das Leukosep Röhrchen überführt. Hierauf erfolgte eine 20-minütige Zentrifugation auf 800g ohne Bremse bei Raumtemperatur. Die Erythrozyten kumulierten durch das Lymphoprep und sammelten sich aufgrund der Zentrifugation unterhalb der Membran. Die PBMCs bildeten einen Ring zwischen Serum und Lymphoprep, welcher durch das Zentrifugieren ohne Bremse gut erhalten blieb. Währenddessen erfolgte die Vorbereitung eines neuen 50ml Falcon Röhrchen, in das 10ml PBS vorgelegt wurde. Das Leukosep Röhrchen wurde vorsichtig aus der Zentrifuge geholt und schließlich konnte der Überstand bis zu diesem Ring abgesaugt werden. Daraufhin erfolgte die Überführung des Ringes in das bereits vorbereitete, mit 10ml PBS befüllte Falcon Röhrchen. Die Zellsuspension wurde dann mit PBS auf 50ml aufgefüllt und bei Raumtemperatur auf 350g für 10 Minuten zentrifugiert. Im zweiten Waschschrift wurde sowohl der Überstand als auch das Pellet noch einmal gewaschen, um möglichst alle PBMCs zu extrahieren. Während des Waschvorgangs bereiteten wir in einem kleinen Falcon Röhrchen 1ml *Red Blood Cell Lysis Solution* (Miltenyi Biotec GmbH in Bergisch Gladbach, Deutschland) mit 9ml RNase freiem Wasser verdünnt (1:10) vor. Schließlich konnten die Überstände des Röhrchens aus der Zentrifuge und des anderen Röhrchens vorsichtig abgesaugt werden. Die neu entstandenen Pellets wurden resuspendiert und mittels einer elektrischen Pipettierhilfe mit Pasteurpipettenaufsatz mit jeweils 5ml der Erylyse Lösung versetzt. Dann pipettierten wir die in Erylyse Lösung gelösten Pellets wieder in ein 50ml Falcon Röhrchen zusammen und ließen die Lösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Daraufhin wurde ein weiteres Mal für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf 350g zentrifugiert. Danach erfolgte das Absaugen des Überstandes und die Resuspendierung des Pellets in 10ml *Running Buffer*. Anschließend wurden die Zellen gezählt (siehe 3.2.3 Zellzählung). Nach dem Zählen führten wir eine erneute Zentrifugation der 10ml Zellsuspension auf 300g für 10 Minuten bei 4 Grad Celsius durch und konnten schließlich den Überstand absaugen. Das Zellpellet wurde in 40µl *Running Buffer* pro 10^7 Zellen resuspendiert. Hiernach erfolgte das Hinzufügen von 10µl *Pan B Cell Biotin-Antibody Cocktail* (Miltenyi Biotec GmbH in Bergisch Gladbach, Deutschland) pro 10^7 Gesamtzellzahl und eine weitere Inkubation für 5 Minuten im Kühlschrank (2-8 Grad Celsius) im Dunkeln. Danach wurden 30µl *Running Buffer* pro 10^7 Zellen dazu gegeben und 20µl *Anti-Biotin MicroBeads* (Miltenyi Biotec GmbH in Bergisch Gladbach, Deutschland) pro 10^7 Zellen hinzugefügt. Nach weiteren 10 Minuten Inkubationszeit im Kühlschrank bei 2-8 Grad Celsius hatte der Antikörper-Cocktail an alle Nicht-B-Zellen gebunden. Darüber hinaus banden die *MicroBeads* die biotinylierten Antikörper auf den Zellen und markierten sie hiermit magnetisch.

Je nach Gesamtzellzahl verwendeten wir LS Säulen oder MS Säulen (Miltenyi Biotec GmbH in Bergisch Gladbach, Deutschland) für die magnetische Zellseparation. Zusätzlich erfolgte stets die Anwendung eines *Preseparation* Filters mit 30µm Netzgröße (Miltenyi Biotec GmbH in Bergisch Gladbach, Deutschland), um zu verhindern, dass Zellklumpen die Säule verstopften. Zunächst wurde die Säule mit *Running Buffer* equilibriert (MS: 500µl *Running Buffer*; LS: 3ml *Running Buffer*). Bei der MS Säule war sicherzustellen, dass die markierten Zellen in Suspension mindestens 500µl betragen. War dies nicht der Fall, wurde die Zellsuspension auf 500µl mit *Running Buffer* aufgefüllt. Schließlich konnte die gesamte

Zellsuspension auf die Säule gegeben werden und in einem neuen 15ml Falcon Röhrchen aufgefangen werden. Das PBMC Röhrchen wurde zwei weitere Male mit MACS Quant *Running Buffer* gespült und ebenfalls auf die Säule gegeben (MS: 500µl *Running Buffer*; LS: 3ml *Running Buffer*). Abschließend wurde die Säule ein letztes Mal mit MACS Quant *Running Buffer* (Miltenyi Biotec GmbH in Bergisch Gladbach, Deutschland) gewaschen, ohne vorher das PBMC Röhrchen auszuspülen. Die so gewonnenen B-Zellen wurden nach selbigem Prinzip wie zuvor gezählt (siehe 3.2.3 Zellzählung).

Nach der Zählung nahmen wir zweimal 100.000 Zellen ab und gaben diese in ein Eppendorf Röhrchen. Diese Zellen verwendeten wir im Weiteren für die *Realtime* PCR (siehe 3.4.1 Aufreinigung der RNA). Zum Konservieren dieser Zellen wurden 350µl *RLT Buffer* (Qiagen in Venlo, Niederlande; in Hilden, Deutschland) in jedes Eppendorf Röhrchen hinzugegeben und vorsichtig mit den Zellen vermischt. Wir pipettierten das Lysat direkt auf jeweils ein *QIAshredder spin column Buffer* (Qiagen in Venlo, Niederlande; in Hilden, Deutschland), die in einem 2ml Sammelröhrchen standen. Die beiden *spin columns* wurden dann in einer kleinen Zentrifuge bei 14,000rpm für zwei Minuten zentrifugiert. Die Säule konnte schließlich entfernt werden und das durchgelaufene Lysat wurde beschriftet und bei -80 Grad Celsius eingefroren.

Die restlichen B-Zellen wurden je nach Gesamtzellzahl in unterschiedlichen Zellzahlen in folgendem Schema auf eine *cellstar 96 well* Platte ausgesät.

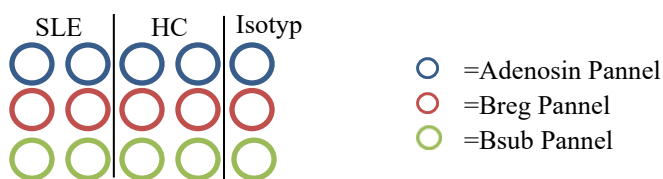


Abb. 5: Aussähschema für die Durchflusszytometrie Analyse.

Doppelmessung SLE, Doppelmessung HC (*Healthy control*) und einfach Messung Isotypkontrolle

3.2.3 Zellzählung

Die Zellzahl wurde mithilfe des *Macs Quant Analyzer 10* (Miltenyi Biotec GmbH in Bergisch Gladbach, Deutschland) ermittelt. Dazu wurden 2µl Zellsuspension mit 198µl *Running Buffer* in einem Eppendorf Röhrchen verdünnt. Das Gerät detektiert jede einzelne Zelle in den 200µl Lösung, die den Laserstrahl passiert, sodass wir nach der Zählung eine Gesamtzellzahl in den 200µl erhielten und somit seine Gesamtzellzahl der 10ml bestimmen konnten. Alternativ wurden die Zellen in einer Neubauer Zellkammer gezählt. Dazu wurden 10µl der reinen Zellsuspension in die Kammer gegeben und alle vier Großquadrate ausgezählt. Von den vier Großquadraten wurde dann der Mittelwert bestimmt und mit 10^4 und 10ml multipliziert, um die Gesamtzellzahl der 10ml Gesamtvolumen zu ermitteln.

3.3 Durchflusszytometrie (FACS)

3.3.1 Allgemeines Funktionsprinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, welches die phänotypische Charakterisierung einer Zelle aufgrund verschiedener Proteine auf der Zelloberfläche ermöglicht. Die Proteine auf der Zelloberfläche werden mit einem passenden fluoreszenzmarkierten Antikörper versehen, der

sie detektierbar macht. Aus einem Zellgemisch nimmt das Durchflusszytometer eine bestimmte Menge der Suspension auf. Diese wird durch eine dünne Kapillare gedrückt, sodass einzelne Tropfen entstehen, die immer nur eine Einzelzelle enthalten. Jeder Tropfen passiert daraufhin verschiedene Laserstrahlen. Man detektiert folgend gestreutes Licht und eine Fluoreszenzemission. Die Intensität des vorwärts gestreuten Lichts ist ein Maß für die Zellgröße, auch *forward scatter* (FSC) genannt. Licht, welches zur Seite gestreut wird, beschreibt die Zelldichte und Granularität der Zelle, auch *sideward scatter* (SSC) genannt. Die gemessene Fluoreszenz zeigt zunächst, wie gut die Fluoreszenzmarkierung funktioniert und gibt somit eine Aussage über die Expression bestimmter Oberflächenproteine auf der Zelle. Alternativ kann ein weiterer Antikörper zur Messung hinzugezogen werden, jedoch unter Beachtung, dass sich das Emissionsspektrum des ersten Antikörpers nicht mit dem des zweiten überschneidet. Dies macht dann Mehrfachfärbungen in einem Zellgemisch möglich.

Die Messung wurde mit dem *Macs Quant Analyzer 10* vorgenommen. Das Gerät besitzt drei verschiedene Laser und insgesamt acht Kanäle: violett (405nm) mit zwei Kanälen für VioBlue und VioGreen, blau (488nm) mit vier Kanälen für FITC, PE, PerCP/PerCP-Vio700 und PE-Vio770, sowie rot (635nm) mit zwei Kanälen für APC und APC-Vio770. Folgende Farbstoffe wurden verwendet: VioBlue, Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), PE-Vio770, Perdinin Chlorophyll-Protein (PerCP), Allophycocyanin (APC) und APC-Vio770.

3.3.2 Durchführung

Die durchflusszytometrische Messung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Im folgenden Experiment wurde vor den Messungen zunächst eine Kompensation vorgenommen. Dazu erfolgte die Färbung von B-Zellen einzeln mit den sechs verschiedenen verwendeten Fluorochromen und daraufhin folgte die Kompensation an diesen Zellen. Somit konnte ein teilweises Einstrahlen von einem Fluorochrom in ein anderes Emissionsspektrum beeinflusst werden.

Bevor die Zellen mit den Antikörpern versetzt wurden, wurden sie für 5 Minuten bei 350g und 4 Grad Celsius zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und mit 2µl *FcR Blocking Reagent* (Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) sowie mit 18µl *MACS Quant Running Buffer green* 10 Minuten im Kühlschrank vorinkubiert, um mögliche unspezifische Bindungen am FcR-Fragment zu verhindern. Danach pipettierten wir in jedes Well 1,25µl der passenden Antikörper des zu betrachtenden *Pannels*. Schließlich erfolgte erneut eine 10-minütige Inkubation des Gemisches im Kühlschrank und eine Waschung der *Wells* mit 200µl *MACS Quant Running Buffer green*. Die Zellen wurden in 200µl *MACS Quant Running Buffer green* resuspendiert. Abschließend erfolgte die Messung der Proben mit dem Durchflusszytometrie Gerät.

3.3.3 Auswertung – Gating-Strategie

In jedem Versuch mittels Durchflusszytometrie erfolgte stets die Betrachtung von mindestens einem SLE Patienten und einer gesunden Kontrolle in einer Doppelbestimmung.

Die Auswertung der Durchflusszytometriedaten und Darstellungen wurde mit Flowlogic Software (Version MACS Miltenyi Biotec) und R (Version 3.5.1 R Core Team) durchgeführt.

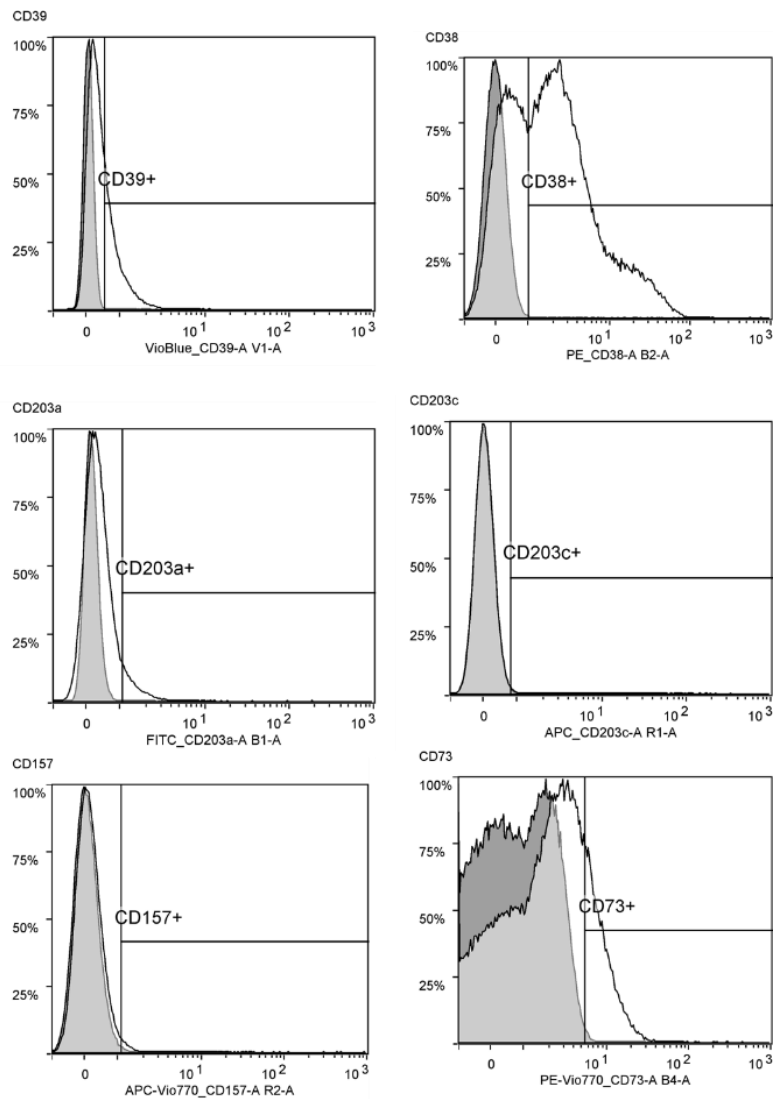


Abb. 6: Gating-Strategie zur Analyse der Adenosinkaskade.

Die Histogramme zeigen Expression von CD39, CD38, CD203a, CD203c, CD157 und CD73 auf B-Zellen, überlagert mit grau schattierten Histogrammen, die auf die Isotypfärbung hinweisen. Gating anhand der Isotypkontrollen; alle gezählten Zellen rechts des Isotypen sind als positiv gewertet worden, das heißt das betrachtete Merkmal ist auf der Zelle vorhanden. FACS Analyse mit Flowlogic Software, Auswertung und Darstellung mit R 3.5.1.

Im unter 6.3 folgenden Ergebnisteil wurde die Zelle nicht nur auf ein Zellmerkmal hin betrachtet, sondern auf mehrere Oberflächenmerkmale gleichzeitig, die wiederum in einer bestimmten Kombination bestimmte Zellsubpopulationen definieren (siehe 5.3 B-Zellschubpopulation).

3.4 Vorbereitung PCR

3.4.1 Aufreinigung der RNA

Die gesamte zytoplasmatische RNA aus den menschlichen B-Lymphozyten wurde mithilfe des RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gewonnen, das bis zu 45µg RNA aus Zellen und Gewebeproben aufreinigen kann. Hierfür tauten wir die zuvor nach der B-Zell-Separation in RLT Puffer eingefrorenen B-Zellen bei Raumtemperatur auf. Dann wurden 350µl 70%

Ethanol zum Lysat hinzugefügt und dies gut vermischt. Die nun insgesamt 700µl Probenmaterial transferierten wir in eine RNeasy MinElute *spin column* (Qiagen, Hilden, Deutschland), die in einem 2ml Sammelröhrchen stand. Beide *spin columns* wurden dann bei 10,000rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Um die Membran der Säule zu waschen, erfolgte die Hinzugabe von 350µl RW1 auf die Säule und eine weitere Zentrifugation für 15 Sekunden bei 10,000rpm. Der Puffer RW1 enthält ein Guanidinsalz, sowie Ethanol, wodurch Biomoleküle wie Kohlenhydrate, Proteine und Fettsäuren, die unspezifisch an die Membran gebunden sind, wirksam entfernt werden können. Gleichzeitig blieben RNA-Moleküle, die größer als 200 Basenpaare waren, an der Säule gebunden. Pro Röhrchen wurden jetzt 10µl DNase I *stock solution* (Qiagen, Hilden, Deutschland) und 70µl RDD Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) vorsichtig vermischt und genau auf die Membran gegeben, damit der Verdau der DNA funktionierte. Der RDD Puffer stellt sicher, dass die RNA auf der Säule bleibt und der DNA Verdau reibungslos abläuft. Das Gemisch wurde nun bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Es folgten mehrere Waschstschritte: zunächst wurden 350µl RW1 Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) dazu gegeben, wieder 15 Sekunden bei 10,000rpm zentrifugiert und der Durchfluss und das Sammelröhrchen verworfen. Dann fügten wir 500µl RPE (Qiagen, Hilden, Deutschland) auf die Säule im neuen Sammelröhrchen hinzu, zentrifugierten erneut und verwarfen den Überstand. Zuletzt wurden 500µl 80% Ethanol auf die Säule gegeben und für zwei Minuten bei 14,000rpm zentrifugiert. Nochmals verwarfen wir den Durchfluss und das Sammelröhrchen und die Säule konnte in einem neuen 2ml Sammelröhrchen platziert werden. Diese wurden nochmals für fünf Minuten auf höchster Stufe zentrifugiert. Die RNeasy MinElute *spin column* wurde in einem neuen 1,5ml Sammelröhrchen platziert. Um die RNA zu eluieren, erfolgte zunächst die Hinzugabe von 14µl RNase freiem Wasser genau auf die Mitte der Membran und anschließend eine erneute Zentrifugation auf höchster Stufe für eine Minute. Der Durchfluss wurde nun noch einmal mit einer Pipette aufgenommen, auf die Mitte der Membran gegeben und eine Minute bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert.

Die gewonnene RNA wurde sofort auf Eis gestellt.

Die beiden Proben à 100.000 Zellen desselben Patienten wurden vermischt, bevor die RNA Konzentration mit dem Nanophotometer gemessen wurde. Hierzu konnte 1µl der Probe nach gutem Durchmischen auf die Mitte des Messfensters pipettiert werden. Der Deckel 10 mit einer *pathlength* von 1mm wurde verwendet. Am Ende der Messung erhielten wir die RNA Konzentration in ng/µl.

3.4.2 Synthese der cDNA

Zur Gewinnung der cDNA erfolgte die Aufteilung der RNA einer Probe auf zwei PCR Röhrchen, sodass sie jeweils 12µl RNA enthielten. Um cDNA zu erhalten, wurde das QuantiTect *Reverse Transcription* Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Bei diesem Verfahren erfolgt die Entfernung der genomischen DNA durch gDNA-Wipeout-Buffer (Qiagen, Hilden, Deutschland). Danach wurden die Quantiscript-*Reverse*-Transkriptase, der Quantiscript-*RT-Buffer* und ein RT-Primer-Mix in der richtigen Menge zugegeben, um die cDNA-Synthese zu starten (Qiagen, Hilden, Deutschland). Demnach fügten wir 2µl *Wipeout Buffer* in das PCR Röhrchen hinzu und inkubierten dies für zwei Minuten bei 42 Grad Celsius im *Thermocycler*. Danach wurde 1µl Quantiscript-*Reverse*-Transkriptase mit 5µl Quantiscript-

RT-*Buffer* hinzugefügt und zunächst für 30 Minuten bei 42 Grad Celsius inkubiert. Zuletzt erfolgte eine weitere Inkubation für drei Minuten bei 95 Grad Celsius im *Thermocycler*, um die Enzymreaktion zu stoppen.

Insgesamt erhielten wir pro Patient beziehungsweise pro gesunder Kontrolle je zweimal 20µl cDNA. Die gewonnene cDNA wurde auf Eis gestellt.

3.5 Realtime PCR

3.5.1 Prinzip

Mittels quantitativer Echtzeit-PCR können Nukleinsäuren nach dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt und DNA kann quantifiziert werden. Die Quantifizierung der DNA ist möglich, da man Fluoreszenz Signale während der Zyklen der PCR misst. Zuvor gibt man einen Farbstoff (*SYBR Green*) zu der Probe hinzu, welcher dann mit der kleinen Furche der Doppelstranghelix interkaliert. Durch die Bindung steigt die Fluoreszenz des Farbstoffes an, das heißt die Zunahme der gebundenen DNA korreliert mit der Zunahme der Fluoreszenz in den steigenden Zyklen.

3.5.2 Durchführung

Vor dem Pipettieren in die PCR-Röhrchen für die Realtime-PCR vermischten wir die zweimal 20µl gewonnenen cDNA Proben der jeweiligen gesunden Kontrolle oder des SLE Patienten und verdünnten die Probe mit 20µl RNase-freiem Wasser, sodass man insgesamt 60µl Ausgangsvolumen pro Probe erhielt.

Verschiedene Primer wurden in diesem Ansatz angesehen/verwendet: einige von ihnen waren selbst entworfen von Frau K. Krebber (*housekeeper* B2M, Adora1, Adora2A, Adora2B, Adora3), andere (CD38, CD39, ADA1, BST1, ENPP1, ENPP3, CD73) wurden von Qiagen (Hilden, Deutschland) hergestellt.

Kürzel	Target	Primer	Primersequenz	Primerlänge	Produktlänge
ADORA1	Adenosine A1 Receptor	Fwd 5'-3'	TCGAGTTGACCTTCT GAACATG	22	
ADORA1	Adenosine A1 Receptor	Rev 5'-3'	TTTTATTAGTCACAT GGGCCTCC	23	115
ADORA2A	Adenosine A2A Receptor	Fwd 5'-3'	TGGAGTGACAAAGC TGGGAT	20	
ADORA2A	Adenosine A2A Receptor	Rev 5'-3'	CCTCTCACTGGGTAG CTCTG	20	138
ADORA2B	Adenosine A2B Receptor	Fwd 5'-3'	AGCAGATGTCAAGA GTGGGA	20	
ADORA2B	Adenosine A2B Receptor	Rev 5'-3'	AATGAAAACCAGCC GTGTCC	20	136
ADORA3	Adenosine 3 Receptor	Fwd 5'-3'	TGTCACCTTCCTTTC ATGCC	20	
ADORA3	Adenosine 3 Receptor	Rev 5'-3'	TGTCAAGATAGATGG CGCAC	20	119
B2M	Beta-2- Microglobulin	Fwd 5'-3'	AGTATGCCTGCCGTG TGAA	19	
B2M	Beta-2- Microglobulin	Rev 5'-3'	TCATCCAATCCAAAT GCGGC	20	115

Tabelle 2: Eigenschaften der selbst erstellten Primer für *Homo sapiens*.

Primersequenz, Primerlänge und Produktlänge der Primer. Fwd= *forward*; Rev= *Reverse*.

Für die quantitative Echtzeit-PCR wurde QuantiTect SYBR *Green* (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet, das eine HotStarTaq-DNA-Polymerase und eine Mischung von dNTPs (desoxy-Nukleotidtriphosphate) in einer Zusammensetzung von PCR-Puffer enthält. Dieser Mastermix enthält auch dUTP (desoxy-Uridintriphosphat), welches eine Vorbehandlung mit Uracil-N-Glycosylase (UNG) vor Beginn der PCR ermöglichte, wodurch sichergestellt wurde, dass die Reaktion nicht durch Kontaminationen beeinflusst wird. Solche Verunreinigungen eines PCR-Ansatzes entstehen durch den Gebrauch des gleichen Gerätes innerhalb eines Laboratoriums. Durch den Zusatz von dUTP und des Enzyms Uracil-N-Glycosylase lassen sich die Verunreinigungen und falsch-positiven Ergebnisse bei einer Hot-Start-PCR vermeiden. Uracil-Reste können spontan entstehen, wenn Cytosin durch die Einwirkung bestimmter Chemikalien oder durch UV-Strahlung oxidativ desaminiert wird. Es kann in der DNA zu Mutationen (Austausch eines GC-Paares gegen ein AT-Paar) kommen durch die Desaminierung von Cytosin zu Uracil, daher ist dieses Reparaturenzym in der Zelle wichtig. Eine DNA mit fehlenden Basen ist bei höherer Temperatur nicht mehr stabil und wird enzymatisch abgebaut. Nachdem dUTP und das Reparaturenzym Uracil-N-Glycosylase dem PCR-Ansatz hinzugefügt worden sind, wurde der Ansatz für zwei Minuten auf 50 Grad Celsius erhitzt, sodass das Enzym in diesem Schritt alle Uracil-Reste aus DNA-Molekülen vorheriger PCR-Ansätze entfernen konnte. Schließlich wurde über einen weiteren Erhitzungsschritt (15 Minuten bei 95 Grad Celsius) das Enzym inaktiviert, mit der Folge, dass es nicht mehr auf die neu synthetisierten PCR-Produkte wirken kann. Auch wurde das Phosphat der kontaminierten Moleküle an den Stellen, die keine Base mehr enthalten, gespalten.

Für die selbst entworfenen Primer wurden 12,5µl SYBR *Green* (Qiagen in Venlo, Niederlande; in Hilden, Deutschland), 9µl RNase-freies Wasser und 0,75µl von *Forward Primer* und *Reverse Primer* in jede Vertiefung einer PCR-Platte pipettiert. Bei der Arbeit mit den Qiagen-Primern

wurden 12,5µl SYBR *Green*, 8µl RNase-freies Wasser und 2,5µl des jeweiligen UL-Primers verwendet. Es wurden immer zwei gesunde Kontrollen und zwei SLE Patienten gleichzeitig in einer Doppelbestimmung mit den gleichen Primern getestet. Nach dem Pipettieren wurden 2µl cDNA pro Probe in das passende *Well* zugegeben. Für die negative *Template*-Kontrolle wurden 2µl RNase-freies Wasser und für die Referenz 2µl DNA-Referenz hinzugefügt. Somit ergab dies immer 8 *Wells* pro Primer mit 4 verschiedenen Proben aufgrund der Doppelbestimmung, 2 *Wells* mit DNA-Referenz und 4 *Wells* mit RNase-freiem Wasser als negative *Template*-Kontrolle. Es wurde versucht, Proben mit ähnlichen Mengen an ng/µl RNA einzusetzen. Zuletzt erfolgte die Verklebung der PCR-Platte mit einer speziellen Folie, sodass die Proben nicht verdunsten konnten und vor Kontaminationen geschützt waren.

Die optimale Temperatur für den Qiagen Primer beträgt 60 Grad Celsius. Für die selbst hergestellten Primer gibt es verschiedene ideale Temperaturen, die zuvor am PCR Gerät eingestellt wurden: Adora 2B läuft bei 53 Grad Celsius, Adora 2A und B2M bei 55 Grad Celsius und Adora 1 & 3 bei 56 Grad Celsius.

Nachdem die PCR-Platte vom PCR-Gerät analysiert wurde, sind die Ergebnisse ausgelesen und analysiert worden (siehe 3.5.3 Auswertung).

3.5.3 Auswertung

Ein Versuchszyklus beinhaltete immer Proben von zwei SLE Patienten und zwei gesunden Kontrollen, die jeweils in einer Doppelbestimmung mit den unterschiedlichen Primern untersucht worden sind. In 45 PCR-Zyklen wurde untersucht, wie groß die Menge an mRNA in den B-Zellen war. Als verwertbare Produkte wurden diejenigen in die Auswertung genommen, die vor dem vierzigsten Zyklus ein Produkt zeigten, die keine Primerdimere gebildet hatten und die eine in Bezug auf die Referenz RNA saubere Schmelzkurve zeigten. Aus diesem Grund können die n-Zahlen der HC (*healthy control*) oder SLE in den folgenden Auswertungsgraphen je nach untersuchtem Enzym leicht abweichen.

Primerdimere können als Nebenprodukt bei einer quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (*quantitative Realtime Polymerase Chain Reaction*; qRT-PCR) entstehen. Hierbei passen zwei Primermoleküle über komplementäre Basenpaare zueinander und hybridisieren. Nachdem die DNA-Polymerase den Primerdimer erweitert hat, fangen Nukleotide an, um die passenden Basenpaare zu konkurrieren. Dies kann den weiteren Ablauf der PCR hemmen und dazu führen, dass zu betrachtende Produkte nicht richtig erkannt werden können. Primerdimere wurden über die charakteristischen Veränderungen der Schmelzkurven erkannt: Die Dimere entstehen unspezifisch und sind in ihrer Länge und Basenzusammensetzung kürzer als die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten und haben somit einen niedrigeren Schmelzpunkt als letztere.

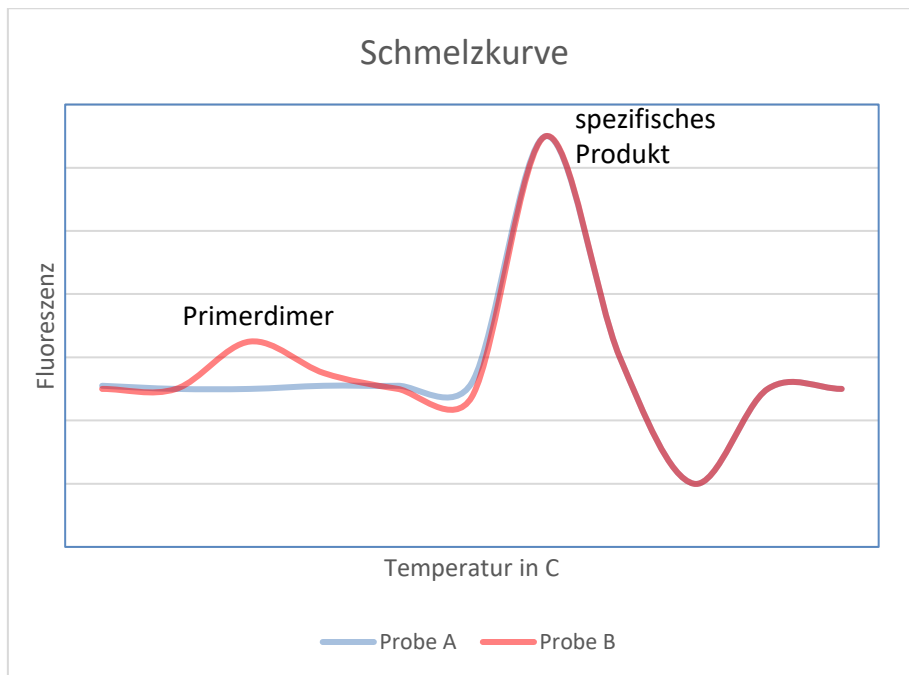


Abb. 7: Schematische Schmelzkurvenanalyse von zwei Proben A und B.

Probe A zeigt eine Spitze, welche das spezifische Produkt darstellt (keine Primerdimere entstanden). Probe B hingegen zeigt eine Spitze für das spezifische Produkt und eine bei niedrigerer Temperatur durch entstandene Primerdimere. C= Celsius

Die statistischen Auswertungen und Abbildungen wurden mit GraphPadPrism 6 erstellt. Die zweiseitigen p-Werte wurden in einem *unpaired t-test* bestimmt. Alle p-Werte $<0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

4 Ethikvotum

Für die durchgeführten Untersuchungen liegt ein positives Votum der lokalen Ethikkommission vor (Interne Studien-Nr. 5714R). Die Untersuchungen wurden in Übereinstimmung mit der revidierten Fassung der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Die Studienteilnahme erfolgte nach Aufklärung durch den Arzt und Einwilligung der Patienten. Das Laborpersonal erhielt nur das abgenommene Blut im Serum- oder EDTA-Röhrchen, welches mit einer Patienten-ID versehen ist, jedoch nicht die Realnamen und die Aufklärungsbögen. Somit konnte die Identität der Probanden durch das Laborpersonal nicht abgeleitet werden. Die personenbezogenen Daten verbleiben für unbestimmte Zeit beim behandelnden Arzt. Die Patientendaten, die erhobenen klinischen Daten und die Befunde weiterer Laboruntersuchungen wurden in pseudoanonymisierter Form elektronisch gespeichert. Die Patienten konnten jederzeit auf eigenen Wunsch die Teilnahme an der Studie beenden, ohne dies rechtfertigen zu müssen.

5 Ergebnisse

Der Ergebnisteil lässt sich in zwei Abschnitte gliedern. Der erste Abschnitt 5.1. beschäftigt sich im Wesentlichen mit den Ergebnissen der quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR). Zum einen wurde die Expression der in Abschnitt 1.2.1 beschriebenen Adenosinrezeptoren auf B-Zellen in SLE Patienten und in gesunden Kontrollen dargestellt und verglichen. Zum anderen wurden ebenfalls mittels qRT-PCR relevante Enzyme der Adenosinkaskade untersucht. Der zweite Abschnitt 5.2. fasst die Ergebnisse zusammen, die die Verteilung der B-Zell-Untergruppen bei SLE und gesunden Kontrollen mittels Durchflusszytometrie Analyse erläutern und die Unterschiede darstellen. Zudem wurden diese B-Zellsubpopulationen speziell auf die Expression des Ektoenzym CD73 untersucht, um herauszufinden, für welche B-Zellen CD73 wichtig sein könnte.

5.1 Ergebnis Adenosinrezeptoren

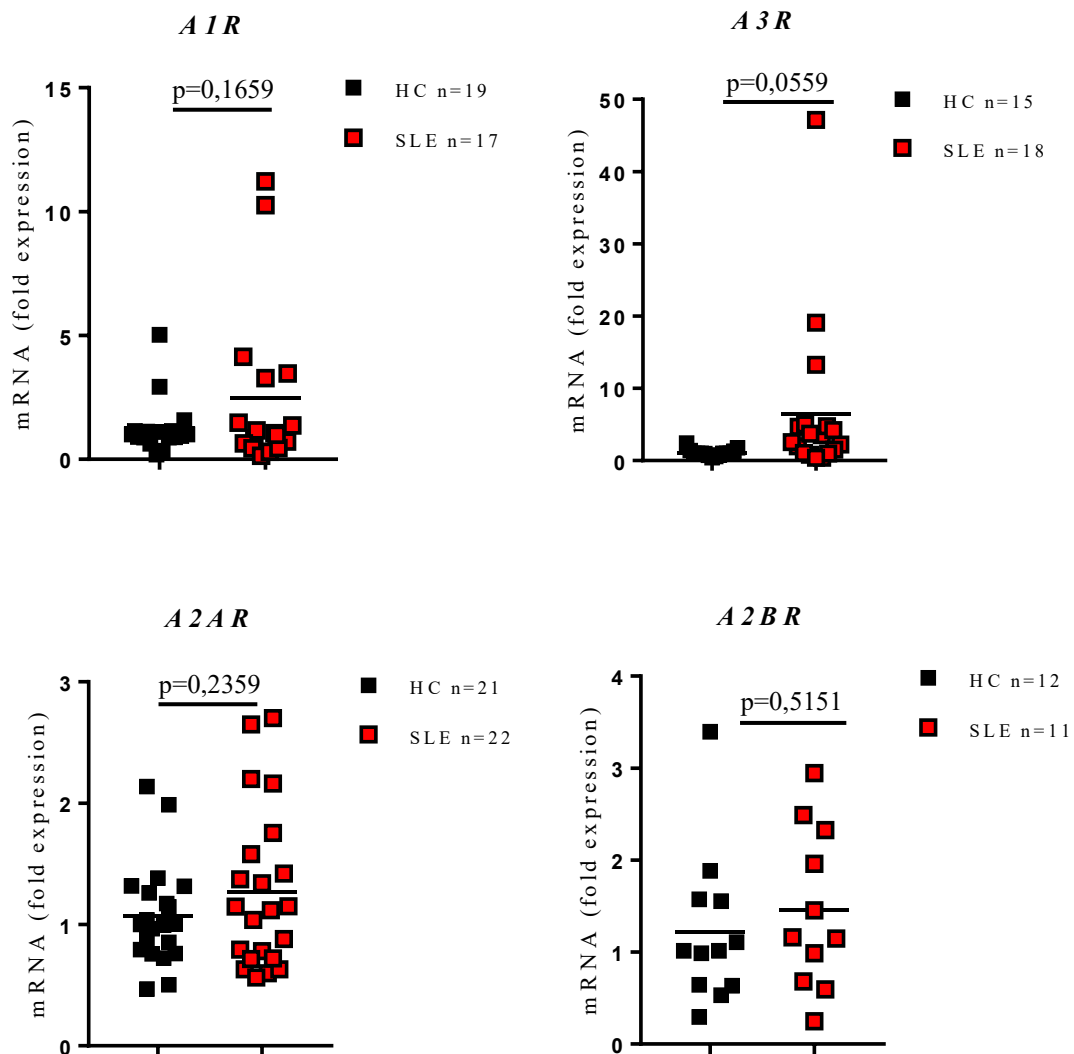


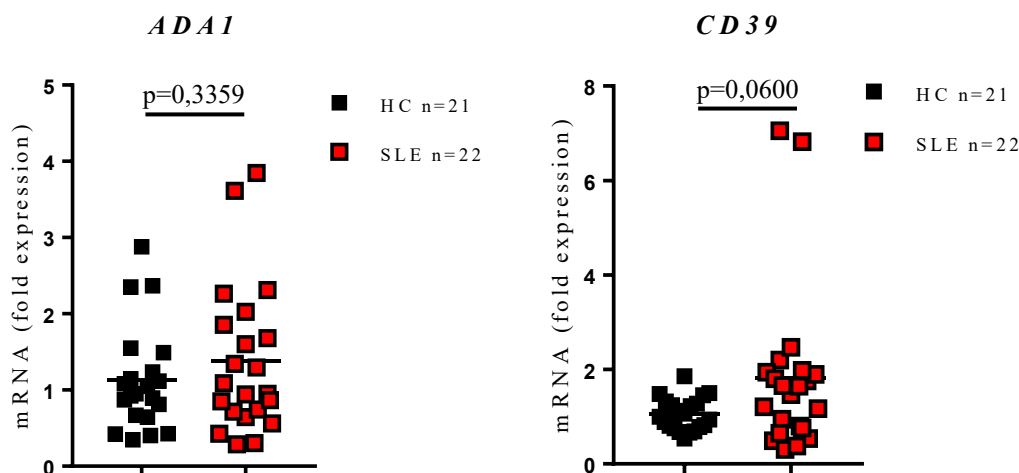
Abb. 8: Expression von Adenosinrezeptoren in humanen B-Zellen.

Die Adenosin-Rezeptor-mRNA-Expression wurde durch qRT-PCR analysiert. Insgesamt wurden 22 gesunde Kontrollen und 22 SLE Patienten untersucht. Die qRT-PCR-Daten für gesunde Kontrollen (HC, n= siehe abgebildete Graphiken) und SLE Patienten (SLE, n= siehe abgebildete Graphiken) sind als individuelle Datenpunkte dargestellt. Der Mittelwert wird durch die horizontale Linie angezeigt. Welch's t-Test, $p < 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet, $p < 0,1$ wird als statistischer Trend betrachtet. A1R = A₁-Adenosinrezeptor; A3R = A₃-Adenosinrezeptor; A2AR = A_{2A}-Adenosinrezeptor; A2BR = A_{2B}-Adenosinrezeptor; mRNA = messenger ribonucleic acid, qRT-PCR = quantitative Realtime Polymerase Chain Reaction.

Die Adenosinrezeptoren wurden untersucht, um eine vermehrte oder verminderte Expression bei SLE Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachzuweisen. Dies könnte je nach Rezeptor die pro-inflammatorische Wirkung beim SLE bei Vorliegen des Liganden Adenosin erklären.

Es wurden Transkripte aller vier Adenosinrezeptoren (A1R, A2AR, A2BR und A3R) in B-Zellen gesunder Kontrollen und Patienten mit systemischem Lupus erythematoses (SLE) nachgewiesen (Abb. 8). Bei keinem der vier untersuchten Rezeptoren konnte eine erhöhte beziehungsweise erniedrigte Expression bei den SLE Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen festgestellt werden. Für den A3 Rezeptor zeigte sich ein statistischer Trend für eine Erhöhung bei SLE im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

5.2 Ergebnis Enzyme der Adenosinkaskade



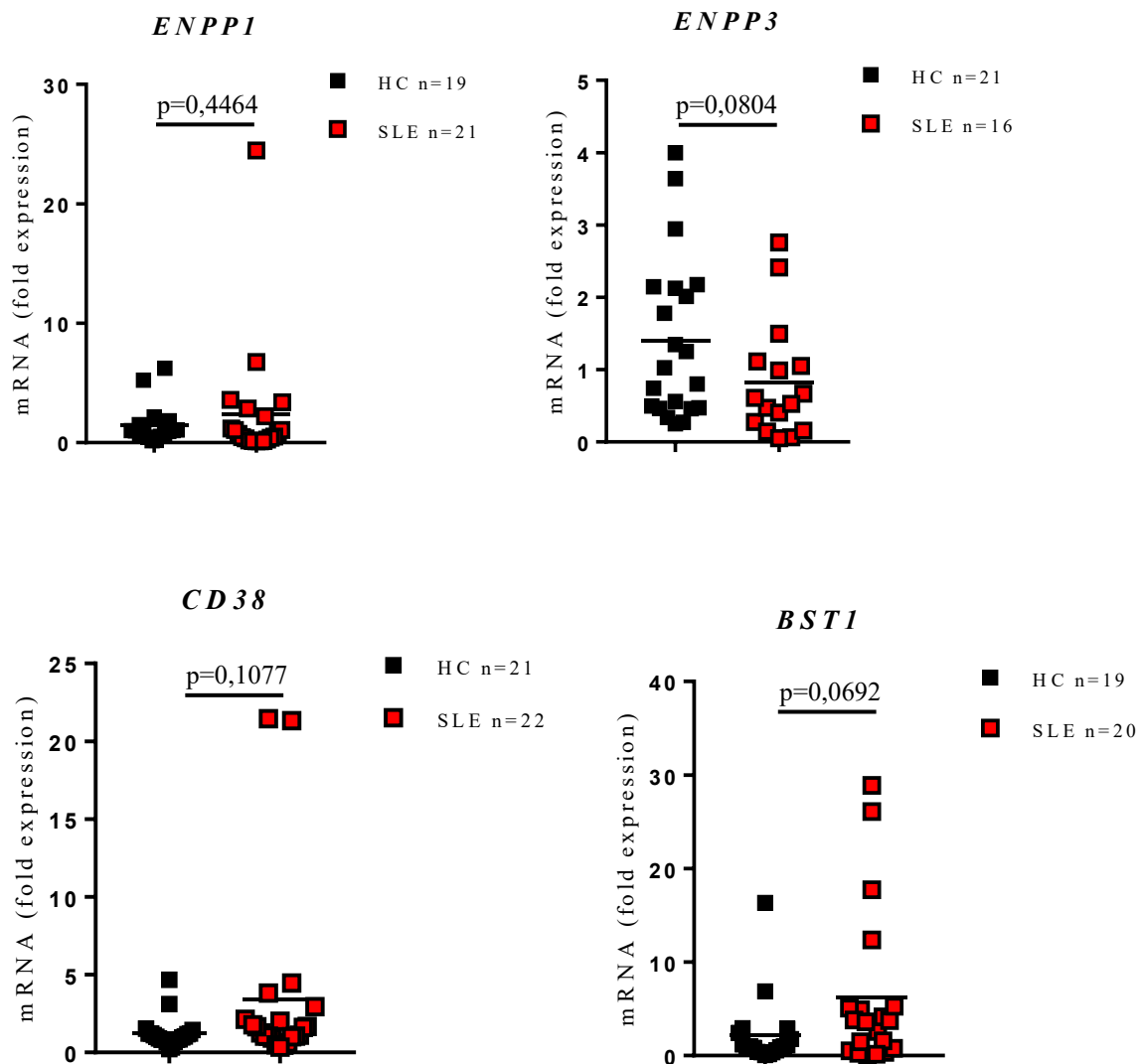


Abb. 9: Expression von Enzymen der Adenosinkaskade in humanen B-Zellen.

Die CD73, CD39, ENPP1 (CD203a), ENPP3 (CD203c), CD38, BST1 (CD157) und ADA1 mRNA-Expression wurde durch qRT-PCR analysiert. Insgesamt wurden 22 gesunde Kontrollen (= HC) und 22 SLE Patienten (=SLE) untersucht. Die qRT-PCR-Daten für gesunde Kontrollen (HC, n= siehe abgebildete Graphiken) und SLE Patienten (SLE, n= siehe abgebildete Graphiken) sind als individuelle Datenpunkte dargestellt. Der Mittelwert wird durch die horizontale Linie angezeigt. Welch's t-Test, $p < 0,05$ wird als statistisch signifikant betrachtet, $p < 0,1$ wird als statistischer Trend betrachtet. CD = *Cluster of Differentiation*; ENPP1 = *Ectonukleotidpyrophosphatase*; BST1 = *bone marrow stromal cell antigen 1*; ADA1 = *Adenosindesaminase 1*; mRNA = *messenger ribonucleic acid*; qRT-PCR = *quantitative Realtime Polymerase Chain Reaction*.

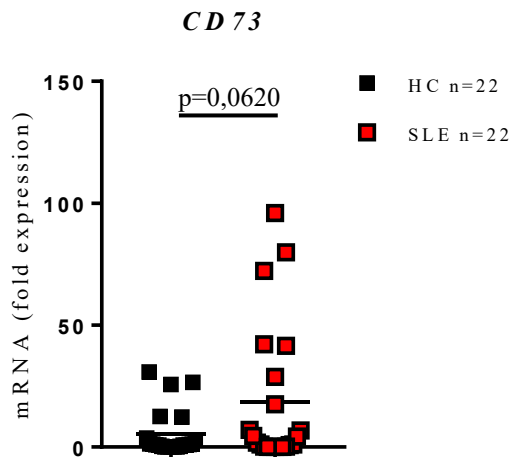


Abb. 10: Expression von CD73 aus der Adenosinkaskade in humanen B-Zellen.

Die CD73 mRNA-Expression wurde durch quantitative RT-PCR analysiert. Die PCR-Daten für gesunde Kontrollen (HC, n= siehe abgebildete Graphiken) und SLE Patienten (SLE, n= siehe abgebildete Graphiken) sind als individuelle Datenpunkte dargestellt. Der Mittelwert wird durch die horizontale Linie angezeigt. Welch's t-Test, $p < 0,05$ wird als statistisch signifikant betrachtet. Insgesamt wurden 22 gesunde Kontrollen und 22 SLE Patienten in 45 Zyklen untersucht. CD = *Cluster of Differentiation*; mRNA = *messenger ribonucleic acid*; qRT-PCR = *quantitative Realtime Polymerase Chain Reaction*.

Ziel dieser Arbeit war es, die Enzyme der Adenosinkaskade zu identifizieren und zwischen SLE Patienten und gesunden Kontrollen zu vergleichen, da diese relevant für die Entstehung von beispielsweise Adenosin sind.

Es wurden Transkripte aller sieben untersuchten Enzyme der Adenosinkaskade in B-Zellen von gesunden und SLE Patienten nachgewiesen (Abb. 9 und 10). Bei fünf der sieben Enzyme, CD73, CD39, BST-1, CD38 und ENPP3 konnte ein Unterschied zwischen den SLE Patienten und den gesunden Kontrollen festgestellt werden. CD73 zeigte bei 22 untersuchten SLE Patienten im Vergleich zu 22 untersuchten Kontrollen den deutlichsten statistischen Trend.

CD39 zeigte einen statistischen Trend ($p = 0,0600$) zwischen SLE Patienten und gesunden Probanden. BST1 konnte mit einem p-Wert von 0,0692 und ENPP3 mit einem p-Wert von 0,0804 ebenfalls einen statistischen Trend im Vergleich aufweisen. CD38 zeigte mit $p = 0,1077$ einen statistischen Trend. Die weiteren zwei Enzyme (ENPP1, ADA1) unterschieden sich nicht bezüglich der Expression auf B-Zellen bei SLE Patienten von gesunden Kontrollen.

5.3 B-Zellsubpopulation

Das Ziel der Untersuchung der B-Zellsubpopulationen war am Ende die Verteilung von CD73 auf den Subpopulationen zu betrachten und herauszufinden, für welche B-Zellsubpopulation CD73 wichtig sein könnte. Des Weiteren ist CD38 als relevant zu erwähnen, welches die Plasmablasten markiert. Wie bereits bekannt, spielt die Subpopulation der Plasmablasten eine Rolle beim systemischen Lupus erythematoses und korreliert mit der Krankheitsaktivität. Außerdem sind CD38 und CD73 relevante Ektoenzyme im Adenosinstoffwechsel.

Es wurden verschiedene B-Zellsubpopulationen im peripheren Blut von Patienten mit systemischen Lupus erythematoses (SLE) in klinisch inaktivem Zustand untersucht und diese mit gesunden Kontrollen mittels Durchflusszytometrie verglichen.

Gemäß der Expression von IgD, CD19, CD21, CD27, CD38 und CD138 wurden die folgenden B-Zellsubpopulationen identifiziert: transitionale B-Zellen (*transitional B cells*): CD19+ CD21+ CD27- CD38+, reife-naive B-Zellen (*mature naive B cells*): CD19+ CD21+ CD27- CD38- CD138-, B-Gedächtniszellen, bei denen kein Klassenwechsel stattgefunden hat (*non switched (ns) memory B cells*): CD19+ IgD+ CD27+, B-Gedächtniszellen, bei denen ein Klassenwechsel stattgefunden hat (*switched memory B cells*): CD19+ IgD- CD27+, erschöpfte B-Gedächtniszellen (*exhausted memory B cells*): CD19+ IgD- CD27- CD21- CD138-, ruhende B-Gedächtniszellen (*resting memory B cells*): CD19+ IgD- CD21+ CD27+ CD38-, frühe Plasmablasten (*early plasmablasts*): CD19+ IgD- CD21+ CD27+ CD38^{high}, späte Plasmablasten (*late plasmablasts*): CD19+ IgD- CD21- CD27+ CD38^{high} und die Plasmazellen (*plasma cells*): CD38^{high} CD138+. Zunächst wurden Zellen der SLE Patienten und der gesunden Kontrollen auf das Vorhandensein der obigen B-Zellsubpopulation untersucht (Abb. 11). Dann wurde in einem weiteren Schritt die Expression des Oberflächenmarkers CD73 auf den definierten B-Zellsubpopulationen betrachtet (Abb. 12). In den beiden Abbildungen (11 und 12) sind die Ergebnisse in positiven Zellen pro 100.000 Zellen angegeben.

Zunächst konnte jede B-Zellsubpopulation sowohl bei den SLE Patienten als auch bei den gesunden Kontrollen identifiziert werden. Die genauere Analyse zeigte, dass der SLE-B-Zell-Pool eine Dominanz in der Gruppe der frühen Plasmablasten aufweist (Abb. 11). Bei den 22 gesunden Kontrollen zeigt sich bei den frühen Plasmablasten eine deutlich geringere Streuung als bei den SLE Patienten in Bezug auf die positiven Zellen pro 100.000 Zellen. Auch bei den Plasmazellen zeigt sich bei den 22 gesunden Kontrollen kaum eine Streuung, wohingegen die 29 SLE Patienten besonders bei den Plasmazellen eine große Streuung innerhalb der Patientengruppe aufweisen. Die reifen naiven B-Zellen und die erschöpften B-Gedächtniszellen in den SLE Patienten waren signifikant reduziert im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Alle anderen B-Zellsubpopulationen wie die B-Gedächtniszellen, die noch keinen Klassenwechsel vollzogen haben, die Plasmablasten, die ruhenden B-Gedächtniszellen, die B-Gedächtniszellen nach Klassenwechsel und die transitionalen B-Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen SLE Patienten und gesunden Kontrollen.

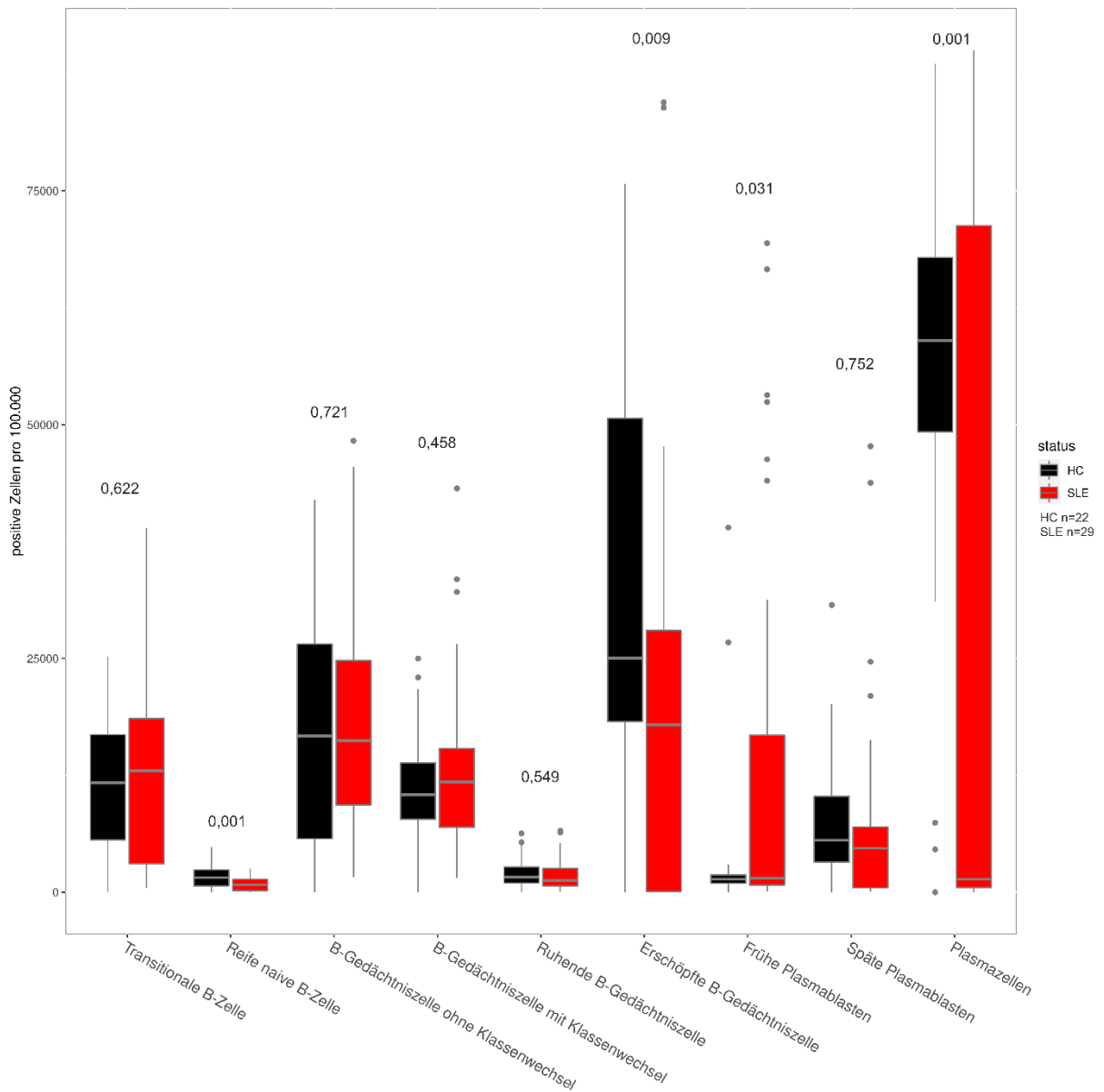


Abb. 11: Vergleich der Verteilung verschiedener B-Zell-Untergruppen in SLE Patienten und in gesunden Kontrollen (HC).

Isolierte Pan B-Zellen wurden aus dem Blut von gesunden Kontrollen und SLE Patienten isoliert und mittels Durchflusszytometrie auf die Oberflächenexpression von IgD, CD21, CD38, CD27, CD138 und CD73 analysiert. Die Verteilung der unterschiedlichen B-Zellsubpopulationen in SLE Patienten (n=29) im Vergleich zu HC (n=22) ist dargestellt. P-Werte <0,05 wurden als signifikant angesehen. Auf der X-Achse ist die jeweilige B-Zellsubpopulation und auf der Y-Achse alle positiven Zellen pro 100.000 isolierter Zellen dargestellt. Die Querstriche zeigen die Mittelwerte an. CD = *Cluster of Differentiation*; *ns memory B cell* = *non-switched memory B cell*.

In Abbildung 12 wurden die oben bereits definierten B-Zellsubpopulationen zusätzlich auf den Oberflächenmarker CD73 untersucht. Zunächst ist ersichtlich, dass es innerhalb jeder Subpopulation B-Zellen gab, die CD73 exprimierten, sowohl bei den gesunden Kontrollen als auch bei den SLE Patienten. In der Regel wurde CD73 im Spätstadium der B-Zelle bei den SLE Patienten exprimiert. Die B-Zellsubpopulationen Plasmablasten und Plasmazellen zeigten eine signifikant erhöhte Expression von CD73 in den SLE Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Innerhalb der Gruppe der erschöpften B-Gedächtniszellen und der reifen naiven B-

Zellen zeigten die SLE Patienten eine signifikant erniedrigte Expression von CD73 im Vergleich zu den gesunden Probanden (Abb. 12). Bei den weiteren B-Zellsubpopulationen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Oberflächenmarkers CD73 zwischen den SLE Patienten und den gesunden Kontrollen.

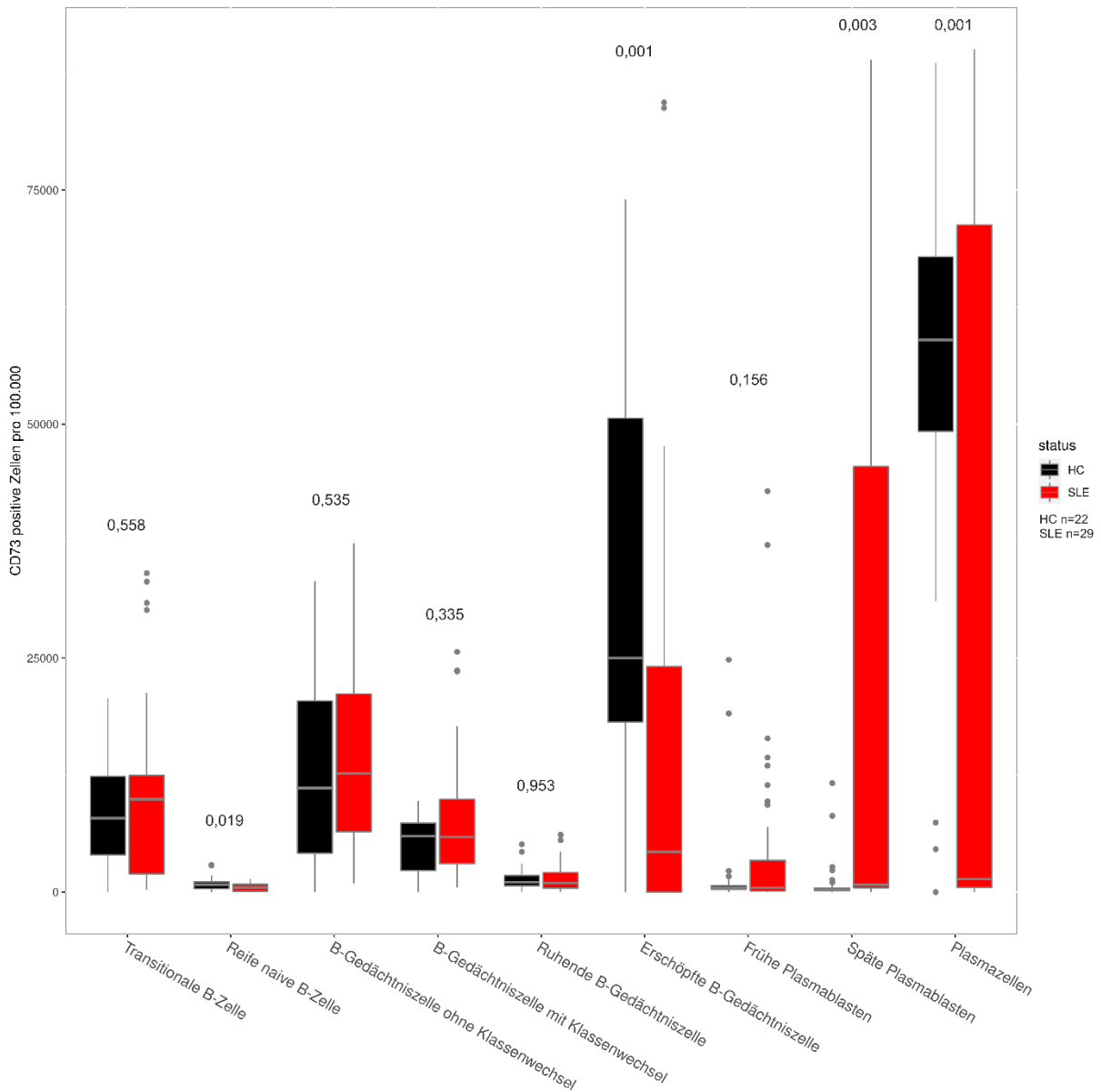


Abb. 12: Vergleich verschiedener B-Zellsubpopulationen in SLE Patienten und in gesunden Kontrollen (HC) hinsichtlich des Oberflächenmarkers CD73.

Isolierte Pan B-Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie auf die Oberflächenexpression von IgD, CD21, CD38, CD27, CD138 analysiert. Anschließend wurden die verschiedenen definierten B-Zellsubpopulationen auf die Expression des Oberflächenmarkers Ecto-5'-Nukleotidase CD73 untersucht. Die Daten repräsentieren n=29 SLE Patienten und n=22 HC. P-Werte <0,05 wurden als signifikant angesehen. Die X-Achse zeigt die jeweilige B-Zellsubpopulation und die Y-Achse alle CD73-positiven Zellen pro 100.000 isolierter Zellen. CD= Cluster of Differentiation; ns memory B cell= non-switched memory B cell.

6 Diskussion

Diese Arbeit erweitert das bisherige Wissen um die Charakterisierung für die Adenosinkaskade wichtiger Moleküle speziell in B-Zellen bei systemischem Lupus erythematoses. Mittels quantitativer Echtzeit-PCR wurden die folgenden Enzyme untersucht: CD38, CD39, ADA, CD203a, CD203c, CD157 und CD73. Des Weiteren haben wir die Hypothese getestet, dass sich die Expression von A1, A2A, A2B und A3 Adenosinrezeptoren in B-Zellen aus Patienten mit SLE von Gesunden unterscheiden. Zudem gibt die Arbeit Einblicke in die B-Zellsubpopulationen und deren Vorkommen und Verteilung bei SLE Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Auf den identifizierten Subpopulationen wurde zusätzlich noch die Expression des Ektoenzym CD73 untersucht, da dies als einziges Enzym Adenosinmonophosphat (AMP) zu Adenosin katalysieren kann und somit als ein Schlüsselenzym der Adenosinkaskade gilt (siehe 1.2.2.1 *CD39* und *CD73*).

6.1 Dysregulation der Adenosinrezeptoren in SLE

Adenosin ist nicht nur ein Abbauprodukt des Adenosintriphosphats (ATPs), sondern auch ein wichtiges Signalmolekül. Über vier verschiedene Rezeptoren, die alle G-Protein gekoppelt sind, entfaltet es seine vielfältige Wirkung (siehe 1.2.1 Adenosinrezeptoren und ihre Signaltransduktion).

Es wurden auf RNA-Ebene alle Transkripte der vier Adenosinrezeptoren (A1R, A2AR, A2BR, A3R) sowohl in B-Zellen von SLE Patienten als auch in B-Zellen der gesunden Probanden nachgewiesen. Allerdings konnte bei keinem der vier untersuchten Rezeptoren eine erhöhte beziehungsweise erniedrigte Expression bei den SLE Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen festgestellt werden. Im Gegensatz zu anderen Autoren (114) beobachteten wir auch keine erhöhte A2AR-Expression in Zellen von SLE Patienten wie Bortoluzzi et al.. Sie schlossen 80 SLE Patienten in ihre Studie ein und verglichen sie mit 80 gesunden Kontrollen, die stets das gleiche Alter und Geschlecht hatten. Außerdem verwenden sie neben der qRT-PCR zusätzlich einen Nachweis auf Proteinebene durch eine Western Blot Analyse. Darüber hinaus untersuchten Bortoluzzi et al. Lymphozyten (B-Zellen, T-Zellen und natürliche Killerzellen), wohingegen unsere Arbeit reine B-Zellen untersuchte (114). Betrachtet man die Ergebnisse von Bortoluzzi et al. und unsere Ergebnisse gemeinsam, kann man abschließend nicht sagen auf welcher Zellreihe (B-Zelle, T-Zelle oder natürliche Killerzelle) sich bei Bortoluzzi die erhöhte A2AR-Expression findet und kann somit nicht mit unseren Ergebnissen bezüglich A2AR-Expression auf B-Zellen verglichen werden.

Wie bereits im Ergebnisteil beschrieben, zeigte die A3R-Expression in SLE B-Zellen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen keine Signifikanz. Drei SLE Patienten zeigten jedoch eine deutlich höhere Expression des A3R als andere. Der Grund dafür ist unklar. In der bisherigen Literatur wurde eine erhöhte Expression des A3R nur auf PBMCs aus Patienten mit rheumatoider Arthritis gefunden (222, 223).

6.2 Erhöhte Expression der Ektoenzyme bei SLE?

Bei einigen der sieben Enzyme konnte eine erhöhte Expression bei den SLE Patienten im Vergleich zu den gesunden Probanden festgestellt werden. CD73 zeigte sich als tendenziell vermehrt exprimiert, zumindest bei einigen SLE Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Im Vergleich zu den Ergebnissen von Schrader et al. wurden hier noch weitere gesunde Kontrollen und SLE Patienten untersucht, sodass der Unterschied in der Expression sichtbar wurde. Es gilt zu diskutieren, ob die Unterschiede klinisch relevant wären und aus welcher grundlegenden Ursache CD73 bei den SLE Patienten vermehrt exprimiert wird.

Zum einen könnte dies grundsätzlich an der Tatsache liegen, dass CD73 hochreguliert wird, wenn B-Zellen aktiviert werden und ein Merkmal des systemischen Lupus erythematodes sind die vermehrt aktivierten B-Zellen. Zum anderen könnte die Hochregulation an der veränderten Zusammensetzung der B-Zellen beim SLE liegen, da, wie auch unsere Ergebnisse bei den B-Zell-Untergruppen zeigen, mehr CD73 positive Zellen bei den Lupus Patienten vorliegen.

CD73 könnte auch erhöht sein, da die Interferon Produktion bei SLE Patienten hochreguliert ist. Interferon wiederum sorgt für eine Hochregulation von CD73. Dies würde für einen vermehrten Umsatz von AMP zu Adenosin sprechen, welches wiederum über seine Rezeptoren eher anti-inflammatorische Wirkungen entfalten würde (43). In der Arbeitsgruppe von Prof. Schrader (molekulare Kardiologie) wurde die Aktivität von CD73 auf SLE B-Zellen gemessen und eine deutliche Reduktion der CD73 katalysierten Adenosinproduktion festgestellt (225). Dies bedeutet, dass trotz erhöhter Expression auf den SLE B-Zellen die Funktion vermindert ist. Wieso die Funktion trotz höher Expression vermindert ist, muss in weiteren Untersuchungen gezeigt werden. Dies würde bedeuten, dass die B-Zellen extrazellulär zu wenig anti-inflammatorisches Adenosin produzieren können und pro-inflammatorisches ATP nicht hinreichend abgebaut wird. Es gilt herauszufinden, auf welcher Ebene sich der Defekt befindet, ob auf genetischer oder bereits zellulärer Ebene. Dabei wurde diese funktionelle Inaktivität des CD73 nur bei B-Zellen, nicht bei T-Zellen beobachtet, und vermutet, dass sie durch posttranslationale Modifikation des CD73 zustande kommt (225). Es entsteht nicht nur zu wenig Adenosin, sondern extrazellulär akkumuliert vermehrt AMP bei einem CD73 Defekt. AMP ist kürzlich auch als Ligand des A2B Rezeptores beschrieben worden. Dies würde lokal den Rezeptor aktivieren und die IL-6 Produktion anregen. IL-6 wiederum ist ein pro-inflammatorisches Zytokin und regt die Reifung von naiven B-Zellen zu Gedächtniszellen oder Plasmazellen an, die Produktion von Autoantikörpern, die Differenzierung von follikulären T-Helferzellen und die Entstehung von Keimzentren (225). Gegebenenfalls könnte die verminderte Funktion von CD73 somit zu einem therapeutischen Angriffspunkt in der Erkrankung des systemischen Lupus erythematodes werden.

In unseren Ergebnissen zeigte CD39 einen statistischen Trend für einen Unterschied der Transkription zwischen SLE B-Zellen und gesunden B-Zellen ($p=0,0600$). Wir untersuchten CD39 auf B-Zellen, wohingegen Becker et al., die eine erhöhte Expression und vermehrte Aktivität von CD39 in SLE Patienten feststellten, Gesamtlymphozyten untersuchten. Becker et al. kommen zu dem Schluss, dass dieser Anstieg einen kompensatorischen Mechanismus darstellen könnte, um die Entzündung in SLE Patienten zu kontrollieren, denn CD39 hat anti-inflammatorische Effekte: Zum einen über den Abbau des ATP, welches sonst über P2 Rezeptoren pro-inflammatorisch wirken würde, und zum anderen die Erweiterung der

Adenosin Produktion (226). Außerdem weiß man, dass die CD39 Expression über entzündungsfördernde Zytokine, oxidativen Stress und Hypoxie reguliert wird (226). CD39 könnte auch ein therapeutischer Ansatzpunkt in der SLE Therapie werden, um die anti-inflammatorische Wirkung in SLE Patienten zu unterstützen. Hier findet man in der Literatur einige Ergebnisse in Bezug auf Inhibition von CD39 (119), jedoch keine bezüglich Aktivatoren.

Auch BST1(CD157) zeigte einen statistischen Trend ($p=0,0692$) bezüglich einer erhöhten Transkription bei den SLE Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Andere Studien weisen ähnliche Ergebnisse auf: Quarona et al. zeigten, dass das CD157 Gen hochreguliert werden kann, wenn die Zelle DNA Schäden erfährt, Entzündungsprozessen oder bestimmten Infektionen ausgesetzt ist (227). Ergänzend hierzu wiesen Ortolan et al. eine erhöhte Expression des CD157 in Patienten mit rheumatoider Arthritis nach (180). Eine weitere Studie untersuchte lösliches BST1 im Serum von Patienten mit rheumatoiden Erkrankungen (228). Das Serum von 68 an SLE erkrankten Patienten wurde mit 30 gesunden Kontrollen verglichen und es zeigte sich ebenfalls ein statistischer Trend hinsichtlich mehr löslichem BST1 bei den SLE Patienten (228). Im Vergleich zu unseren Untersuchungen wurde hier lösliches BST1 untersucht, wohingegen wir BST1 auf B-Zellen in SLE Patienten untersuchten. Lee et al zeigten, dass besonders bei schwer erkrankten Patienten das lösliche BST1 deutlich erhöht war. Sie vermuten, dass das lösliche BST1 die Krankheitsaktivität widerspiegelt, es könnte ein Parameter für eine bestimmte Krankheitsphase sein. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass es eine Untergruppe von RA gibt, die durch einen erhöhten löslichen BST1-Spiegel im Serum und eine schwere Gelenkzerstörung gekennzeichnet ist (228).

In der Adenosinkaskade wandelt BST1 NAD^+ in ADP-Ribose um. In weiteren Schritten führt dies über das Schlüsselenzym CD73 zu Adenosin, welches entzündungshemmend wirkt (siehe 1.2.2 Die Adenosinkaskade). Es konnte gezeigt werden, dass CD73 bei SLE Patienten auf B-Zellen vermehrt exprimiert wird, jedoch inaktiv ist. Folglich kann AMP nicht adäquat zu Adenosin abgebaut werden. Es wird vermutet, dass CD73 bei den SLE Patienten hochreguliert wird aufgrund der Inaktivität. Auch eine vermehrte BST-1 Expression könnte im Zusammenhang mit der Inaktivität von CD73 stehen.

6.3 Verschiebungen in peripheren B-Zellsubpopulationen bei SLE

Man weiß bereits, dass periphere B-Zellen in SLE Patienten übersteigert auf Reize der Zellumgebung reagieren können und spontan Antikörper produzieren (2). Neben der Antikörperproduktion konnte man *in vitro* zeigen, dass heranreifende B-Zellen ohne Kontakt zu bestimmten B-Zellaktivatoren in Antikörper-produzierende Zellen differenzieren können (2, 229–234). Außerdem ist eine zentrale Erkenntnis bei SLE Patienten, dass sich eine Expansion der unreifen transitionalen B-Zellen, der B-Gedächtniszellen und der Plasmazellen im peripheren Blut finden lässt, verbunden mit einer Abnahme der Anzahl an naiven B-Zellen (224). Im Folgenden werden unsere Ergebnisse der B-Zellsubpopulationen in den Kontext der Literatur eingeordnet und verglichen.

6.3.1 Reife, naive B-Zellen (*mature naive B cells*)

Odendahl et al. konnten bereits bei Patienten mit aktivem SLE eine B-Zell-Lymphopenie nachweisen. Besonders die Gruppe der naiven B-Zellen, hier als CD19⁺ CD27⁻ definiert, ist

deutlich erniedrigt (2). Hierdurch entsteht eine Dominanz der peripheren B-Zellen, die CD27+ exprimieren. Unsere Untersuchung bestätigt die Ergebnisse von Odendahl et al., denn die Gruppe der naiven B-Zellen zeigte sich bei uns signifikant erniedrigt. Allerdings hatten unsere Patienten meist einen gut kontrollierten systemischen Lupus erythematodes (SLE). Außerdem definierten wir die reifen, naiven B-Zellen als CD19+ CD21+ CD27- CD38- CD138-, wohingegen Odendahl et al. die naiven B-Zellen nur über die Marker CD19+ CD27- definierten. Überdies analysierte Odendahl et al. die gewonnenen PBMCs mittels Durchflusszytometrie und legte durch vorangegangene Studien und hieraus bekannte Oberflächenmarker die B-Zellpopulation fest. In unserer Arbeit hingegen wurden zuvor aus den PBMCs mittels *Magnetic Cell Sorting* reine B-Zellen gewonnen und diese daraufhin in der Durchflusszytometrie genauer untersucht. Auch Dörner et al. postuliert, dass eine wichtige Erkenntnis die Abnahme der Anzahl naiver B-Zellen im peripheren Blut von SLE Patienten ist, verbunden mit einer Expansion anderer Subpopulationen (224). Hier wird jedoch nicht genauer auf die Oberflächenmarker eingegangen. In anderen Studien wiederum erkannte man keinen Unterschied zwischen den SLE Patienten und den gesunden Probanden in Bezug auf die naiven B-Zellen (235) oder man beobachtete über einen bestimmten Krankheitszeitraum, dass naive B-Zellen in Korrelation zur Krankheitsdauer und dem Therapieregime reduziert vorlagen (236). Beide genannten Studien zeigten jedoch, dass je aktiver der systemische Lupus erythematodes bei den Patienten war, desto höher war die Anzahl der naiven B-Zellen (235) oder die CD19+ B-Zellen (236). Auch Szabó et al. zeigten höhere prozentuale Anteile an naiven B-Zellen (CD19+ IgD+ CD27-) in SLE Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden (237). Jacobi et al. konnten zeigen, dass die absolute Zahl der CD27- naiven B-Zellen und die CD27+ B-Gedächtniszellen bei Patienten mit einem SLEDAI >8, die eine intensiviertere Therapie erhielten, signifikant erniedrigt war im Vergleich zu Patienten, die eine weniger intensive Therapie erhielten (236). Jedoch berechnen Jacobi et al. die absolute Zahl (pro Mikroliter Blut) an B-Zellen verschiedener Phänotypen, basierend auf den Frequenzen dieser Zellen unter den PBMCs und der absoluten Anzahl von PBMCs (236). Wir hingegen isolierten die B-Zellen mittels *Magnetic Cell Sorting*. Außerdem schlossen wir nur Patienten ein, die in den letzten 6 Monaten keine B-Zell-supprimierende Therapie erhielten. Odendahl et al. kam zu ähnlichen Ergebnissen wie Jacobi et al. (2). Zusammengenommen entsteht die Hypothese, dass naive B-Zellen sensibler auf eine immunsuppressive Therapie reagieren, als andere B-Zellsubpopulationen (236). Vorangegangene Studien gaben Hinweise darauf, dass die erhöhte Anzahl an naiven B-Zellen in aktiven SLE Patienten, also akut erkrankten Patienten, meist viele selbstreaktive Klone beinhaltet (235, 238, 239). SLE Patienten haben deshalb vermutlich defekte oder dysregulierte B-Zell-Kontrollpunkte und infolgedessen einen deutlichen Anstieg an autoreaktiven naiven B-Zellen, welche relevant für die Pathogenese des systemischen Lupus erythematodes sind (235). Mögliche Ursachen einer Reduktion der naiven B-Zellen können langfristige Einnahme von Immunsuppressiva, ein schneller Umsatz naiver B-Zellen durch verstärkte Aktivierung oder krankheitsassoziierte Antikörper gegen naive B-Zellen sein oder eine relative Zunahme von nicht naiven (aktivierten) B-Zellen (240, 241, 224).

6.3.2 B-Gedächtniszellen (*Exhausted memory B cells*)

Nakayamada postuliert, dass die Anzahl an B-Gedächtniszellen mit der Krankheitsaktivität des SLE korreliert (236, 242, 240, 243). In den genannten Studien wird allerdings nicht in ruhende B-Gedächtniszellen, erschöpfte B-Gedächtniszellen und diese, die bereits einen

Klassenwechsel vollzogen haben oder nicht, unterschieden, so wie in dieser Arbeit untersucht, sodass die Ergebnisse nur schwierig verglichen werden können (242).

Odendahl et al. zeigten, dass die Subpopulation der B-Gedächtniszellen (CD19+ CD27+) bei SLE vermindert ist (2). In unserer Arbeit sind die CD19+ CD27+ Oberflächenmarker den Subpopulationen der B-Gedächtniszellen mit und ohne vollzogenen Klassenwechsel zuzuordnen, die sich hier nicht signifikant vermehrt oder vermindert darstellten. Auch Szabó et al. zeigten, dass CD19+ IgD- CD27+ B-Gedächtniszellen mit Klassenwechsel in der gesamten SLE Patientenpopulation und in den gesunden Kontrollen prozentual ähnlich exprimiert waren (237). Hier stimmen unsere Ergebnisse überein, da die Oberflächenmarker genau gleich definiert sind und die gesamte Gruppe der SLE Patienten in Betracht genommen wird und beispielsweise nicht nur Patienten mit einem SLEDAI >6. Zudem ist jedoch auch bekannt, dass die B-Gedächtniszellen mit Klassenwechsel CD19+ IgD- CD27+ und die CD19+ IgD- CD27- B-Effektor Gedächtniszellen in refraktären SLE Patienten, im Vergleich zu gesunden Kontrollen, vermehrt zu finden sind (242, 244–246). Bei uns hingegen zeigten die B-Gedächtniszellen mit vollzogenem Klassenwechsel kein vermehrtes oder vermindertes Vorliegen. Die von Nakayamada et al. als B-Effektor Gedächtniszellen definierten Zellen passen am ehesten zu unseren erschöpften B-Gedächtniszellen (CD19+ IgD- CD27- CD21- CD138-) und sind bei uns erniedrigt im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Hier findet sich somit trotz der genaueren Oberflächenmarker Definition dennoch keine Übereinstimmung. Dies könnte daran liegen, dass wir zwei weitere Oberflächenmarker (CD21- und CD138-) zur Definition der erschöpften B-Gedächtniszellen einschlossen, welche Nakayamada et al. nicht in Betracht zogen. Auch in Bezug auf die B-Gedächtniszellen ohne Klassenwechsel konnten wir in unserer Arbeit keinen Unterschied wie Szabó et al. nachweisen, der eine Verringerung der CD19+ IgD+ CD27+ B-Zellen bei SLE beschreibt (237).

Des Weiteren zeigten Rodríguez- Bayona et al., dass die doppelt negativen (erschöpften) B-Gedächtniszellen sowohl in der Gruppe der SLE Patienten, die einen milden Verlauf aufwiesen, als auch in der Gruppe mit mittelschweren bis schweren Verläufen, erhöht waren (235). Wir konnten bei unseren meist inaktiven SLE Patienten nur zwei Patienten identifizieren, die erhöhte Werte für die erschöpften B-Gedächtniszellen zeigten. Dies könnte darauf hinweisen, dass diese untersuchten SLE Patienten bereits wieder in eine aktive Krankheitsphase übergegangen waren, die sich klinisch jedoch nicht zeigte. Szabó et al. bestätigen die Erhöhung der doppelt negativen (erschöpften) B-Gedächtniszellen in der SLE Gruppe mit einem SLEDAI <6 (237). Unsere Ergebnisse zeigen, dass die erschöpften B-Gedächtniszellen in inaktiven SLE Patienten vermindert sind im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Eine mögliche Erklärung für die abweichenden Ergebnisse könnte die unterschiedliche Definition der verschiedenen B-Zellsubpopulationen sein. Diese Arbeit definierte die Oberflächenmarker zur Auffindung der unterschiedlichen B-Zellsubpopulationen detaillierter, wohingegen sich oben aufgeführte Studien meist auf drei Oberflächenmarker zur Definition der Subpopulation beschränken. Des Weiteren nahmen bei unserer Studie nur SLE Patienten teil, bei denen eine Inaktivität des SLE vorlag. Gegebenenfalls stimmen unsere Ergebnisse auch aus diesem Grund nur in wenigen Punkten mit der aktuellen Literatur überein. Dörner et al. fanden 2009, dass eine Gruppe von CD27- IgD- B-Zellen, die auch CD95 exprimieren, mit der Aktivität des SLE korrelieren. Außerdem findet er anders als Nakayamada et al., dass CD27+ B-Gedächtniszellen nicht stark mit der Krankheitsaktivität variieren (247). Auch hier sieht man, dass das Hinzunehmen eines

Oberflächenmarkers (CD95) und somit eine andere Definition der Zelle den Vergleich der Ergebnisse schwierig macht. Insgesamt bemerkt man, dass die Datenlage in Bezug auf die B-Gedächtniszellen, kontrovers ist und viele Aspekte den direkten Vergleich der Ergebnisse erschweren.

6.3.3 Frühe Plasmablasten (*Early plasmablasts*)

Es ist beschrieben, dass die Anzahl an Plasmablasten mit der Krankheitsaktivität des SLE korreliert (242, 240, 236, 243), allerdings wird in der Studie nicht zwischen frühen Plasmablasten und späten Plasmablasten unterschieden, was es erschwert die Ergebnisse mit unseren Ergebnissen zu vergleichen. Wir fanden ein erhöhtes Vorkommen für frühe Plasmablasten (CD19⁺ IgD⁻ CD21⁺ CD27⁺ CD38^{high}) bei den inaktiven SLE Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Nakayamada et al. fanden, dass die Aktivität der Krankheit mit der Zellzahl korreliert (242). Die Definition der Plasmazelle vieler Autoren entspricht unserer Definition von frühen und späten Plasmablasten (Abschnitt 7.4.4 Plasmazellen). Szabó et al. fanden bei SLE Patienten mit einem SLEDAI > 6 eine deutlich höhere Frequenz von CD19⁺ CD38^{high} CD27^{high} Plasmablasten im Vergleich zu gesunden Probanden (237). Ob der SLEDAI bei diesen Patienten nicht deutlich über 6 lag, ist den Ergebnissen nicht zu entnehmen. Außerdem gilt es zu berücksichtigen, dass CD38 nicht nur als Marker der Plasmablasten eine wichtige Rolle spielt, sondern auch in der Adenosinkaskade. NAD⁺ wird von CD38 zu ADP-Ribose hydrolysiert. CD38 zeigte in den PCR Untersuchungen einen statistischen Trend (p= 0,1077) zwischen SLE Patienten und gesunden Probanden. Die erhöhte Verfügbarkeit von CD38 sollte über die weiteren Schritte in der Kaskade zu einer vermehrten, entzündungshemmenden Bildung von Adenosin führen (siehe 1.2.2 Die Adenosinkaskade). Im Folgenden wird beschrieben, dass auch CD73 vermehrt exprimiert wird und man somit einen anti-inflammatorischen Effekt über Adenosin erwartet. Es konnte gezeigt werden, dass CD73 auf B-Zellen bei SLE Patienten AMP nicht adäquat zu Adenosin umwandeln konnte. Man vermutet einen Funktionsverlust und eine Hochregulation von CD73 in SLE Patienten. Es wäre interessant zu wissen, ob durch den Funktionsverlust des CD73 als Schlüsselenzym der Adenosinkaskade auch CD38 auf den B-Zellen hochreguliert wird. Dies würde auch unsere Ergebnisse bezüglich des erhöhten Vorkommen für frühe Plasmablasten bei SLE Patienten bestätigen.

6.3.4 Plasmazellen (*Plasmacells*)

Einige Autoren postulieren, dass sich Plasmazellen (CD27^{high} CD38⁺ CD19^{dim} *surface* Ig^{low} CD20⁻ CD138⁺) vermehrt bei aktiven SLE Patienten finden im Vergleich zu inaktiven (2, 235, 224). Dörner et al. fanden, dass Plasmazellen nicht alle CD138 exprimieren (224) und dementsprechend nach unserer Oberflächenmarkerbeschreibung auch noch Plasmablasten sein könnten (224). Das vermehrte Auftreten von Plasmazellen bei SLE bestätigen auch Jacobi et al., und zeigen, dass die Anzahl und Frequenz der Plasmazellen mit den Krankheitsaktivitätsindices (SLEDAI) und anti-dsDNA Titern korreliert (236). Besonders die SLE Patienten mit einem SLEDAI >8 hatten eine gesteigerte Frequenz an Plasmazellen (236). Alter und Geschlecht schienen hingegen in Bezug auf die Plasmazellen keine Rolle zu spielen (236). Auch in unseren Untersuchungen konnte man eine signifikante Vermehrung der Plasmazellen in den SLE Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen beobachten. Allerdings definierten wir die Plasmazellen mit den Oberflächenmarkern CD38^{high} CD138, wohingegen andere Autoren die Plasmazellen eher passend zu unseren frühen oder späten

Plasmablasten definierten (CD19+ IgD- CD21+ CD27+ CD38^{high} und CD19+ IgD- CD21- CD27+ CD38^{high}). Dies würde auch zu unseren Ergebnissen passen, denn wir fanden sowohl eine signifikante Erhöhung der Plasmazellen als auch der frühen Plasmablasten wie bereits unter 6.3.3 Frühe Plasmablasten (*Early plasmablasts*) beschrieben.

Insgesamt sieht man, dass die Datenlage, in Bezug auf die B-Zellsubpopulationen mit Schwerpunkt auf den Plasmazellen eindeutiger ist als bei den B-Gedächtniszellen. Dennoch bereitet die unterschiedliche Klassifizierung über die Oberflächenmarker Schwierigkeiten die Ergebnisse gut vergleichbar zu machen.

6.4 CD73 Expression auf B-Zellsubpopulationen

CD73 ist das entscheidende Enzym in der Adenosinkaskade, welches die Reaktion von AMP zu Adenosin katalysiert. Das entstandene Adenosin wirkt über seine verschiedenen Rezeptoren überwiegend entzündungshemmend (43, 107, 149). Ende der Neunziger Jahre wurde bereits über eine signifikant reduzierte CD73 Aktivität in T-Zellen und über einen Trend zur verminderten CD73 Aktivität in B-Zellen bei SLE berichtet (112). Daraufhin vermutete man erstmals, dass eine reduzierte Adenosinbildungsrate an der Pathogenese des SLE beteiligt sein könnte (112). Unsere Untersuchungen zeigen, dass CD73 meist vermehrt in den höheren Entwicklungsstadien der B-Zellen von SLE Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden exprimiert wurde. So war auf den Plasmablasten und auf den Plasmazellen die CD73 Expression signifikant erhöht im Vergleich von SLE Patienten mit gesunden Kontrollen. Diesen Trend zeigten auch unsere FACS Ergebnisse in Bezug auf die gesamten B-Zellen sowie die PCR Ergebnisse. Dieses Ergebnis widerspricht der oben aufgestellten Hypothese zunächst, denn die erhöhte Verfügbarkeit von CD73 sollte in einer vermehrten, entzündungshemmenden Bildung von Adenosin resultieren. Jedoch konnte in einer Kooperation mit der molekularen Kardiologie (Prof. Schrader) mittels einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)-Analyse gezeigt werden, dass die B-Zellen der SLE Patienten einen deutlichen Defekt beim Abbau von AMP im Vergleich zu den gesunden Kontrollen aufweisen (225). Dies bedeutet, dass die SLE B-Zellen trotz der tendenziell vermehrten, aber zumindest gleichen Expression von CD73 im Vergleich zu gesunden B-Zellen AMP nicht effektiv in Adenosin umwandeln können und somit auch der anti-inflammatorische Effekt reduziert sein sollte. Man vermutet einen Funktionsverlust des CD73 Enzyms durch posttranslationale Modifikation bei den SLE B-Zellen und somit eine eventuell kompensatorische Hochregulation des CD73 in einigen Patienten (225).

Die reifen naiven B-Zellen und die erschöpften B-Gedächtniszellen hingegen zeigten eine signifikant verminderte Expression von CD73 bei den SLE Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Dies bestätigt die Annahme, dass die verminderte Expression von CD73 in die Pathogenese des SLE verwickelt sein könnte. Es wäre nun interessant zu wissen, ob der Funktionsverlust der CD73 spezifisch für eine der Subpopulationen ist.

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass die Homöostase der peripheren B-Zellsubpopulationen bei SLE im Vergleich zu Gesunden gestört ist. Allerdings scheinen die Ergebnisse dieser Arbeit und weiterer Studien teils deutlich zu variieren, was größtenteils an

der schweren Vergleichbarkeit durch die oben diskutierten Unterschiede in Methodik und Patientenkollektiv liegt.

Eine wichtige Erkenntnis in Bezug auf die Untersuchungen der gesamten B-Zellsubpopulationen dieser Arbeit und der damit verglichenen Studien ist, dass man einheitliche und standardisierte Protokolle zur Definition der B-Zell Phänotypen benötigt, was bereits von einigen Wissenschaftlern gefordert wird (224). Wichtig dabei ist nicht nur der Vergleich der Oberflächenmarker oder die Anwendung spezifischer Antikörper zur Identifizierung der Phänotypen der Zelle, sondern auch das Patientenalter, Aktivitätsstatus des SLE, Therapie, Vorerkrankungen und Art des Gewebes, aus dem die Zellen entnommen worden sind (224).

7 Zusammenfassung und Ausblick

Der systemische Lupus erythematodes gehört zum Formenkreis der rheumatischen Autoimmunerkrankungen. Sein heterogenes Krankheitsbild mit Hautveränderungen, Befall verschiedener Körperregionen und laborchemischen Veränderungen macht ihn oft schwer zu diagnostizieren. Aus diesen Gründen ist die Erkrankung in vielen Aspekten noch nicht bis ins Detail erforscht. Adenosin, seine Entstehung und Verstoffwechslung, scheint beim SLE eine entscheidende Rolle bei der Krankheitsentstehung zu spielen.

Es konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass Defekte in der Adenosinkaskade bei SLE Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese des SLE spielen. Bei der Identifizierung und Untersuchung der verschiedenen Enzyme der Adenosinkaskade und der Adenosinrezeptoren (AR) (CD38, CD39, ADA, CD203a, CD203c, CD157, CD73, Adenosinrezeptor 1, 2_A, 2_B, 3) in B-Zellen konnten Transkripte aller Enzyme und Rezeptoren nachgewiesen werden, jedoch stellte sich heraus, dass CD73 als Schlüsselenzym der Adenosinkaskade bei den SLE Patienten vermehrt exprimiert wird. Auch CD39, BST1 und CD38 zeigten einen statistischen Trend im Vergleich zwischen B-Zellen aus SLE Patienten und gesunden Kontrollen.

Inwieweit CD73 hochreguliert wird, dadurch, dass B-Zellen vermehrt aktiviert werden oder über eine vermehrte Exposition gegenüber IFN ist momentan noch unklar. Darüber hinaus zeigte die Arbeitsgruppe von Prof. Schrader, dass das vermehrte CD73 inaktiv ist und somit AMP extrazellulär akkumuliert. Dies kann auch als Ligand am A2B Rezeptor wirken, was zur vermehrten IL-6 Ausschüttung und in der Folge zur Reifung der naiven B-Zellen zu Gedächtniszellen oder Plasmazellen führt. Lösliches CD73 oder spezifische Agonisten oder Antagonisten an Adenosinrezeptoren als einen möglichen Therapieansatz gilt es zu untersuchen.

Auch CD39, BST-1 und CD38 könnten beide kompensatorisch auf B-Zellen hoch reguliert sein und stellen ein potenziell therapeutisches Ziel dar.

Grundsätzlich zeigte sich auch in dieser Arbeit, dass die Homöostase der peripheren B-Zellsubpopulationen bei SLE im Vergleich zu Gesunden gestört ist. Zukünftig ist es hier wichtig, eine bessere Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Studien durch Anpassen der Methodik und des Patientenkollektivs zu ermöglichen. Insgesamt zeigt diese Arbeit Unterschiede in der Verteilung der B-Zellsubpopulation als auch in der Expression der Enzyme der Adenosinkaskade zwischen SLE und gesunden Kontrollen, welche im Rahmen der Pathophysiologie des SLE eine Rolle spielen könnten.

8 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Zhao L, Ye Y, Zhang X. B cells biology in systemic lupus erythematosus-from bench to bedside. *Sci China Life Sci* 2015; 58(11):1111–25.
2. Odendahl M, Jacobi A, Hansen A, Feist E, Hiepe F, Burmester GR et al. Disturbed Peripheral B Lymphocyte Homeostasis in Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology* 2000; 165(10):5970–9.
3. Haskó G, Linden J, Cronstein B, Pacher P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7(9):759–70.
4. IMD Institut für Medizinische Diagnostik Berlin-Potsdam GbR. Was sind Autoimmunerkrankungen? [cited 2020 Oct 5]. Available from: URL: <https://www.imd-berlin.de/spezielle-kompetenzen/autoimmunshyerkrankungen.html>.
5. Watts RA, Conaghan PG, Denton C. *Oxford Textbook of Rheumatology*. 4th ed. Oxford: OUP Oxford; 2013. (Oxford Textbook). Available from: URL: <http://gbv.ebib.com/patron/FullRecord.aspx?p=1630596>.
6. Silman AJ, Smolen JS, Hochberg MC, Weinblatt ME, Weisman MH, editors. *Rheumatology*. Sixth edition. Philadelphia, PA: Mosby/Elsevier; 2015. Available from: URL: <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780323091381>.
7. Fischer-Betz R, Schneider M. Früher Lupus erythematosus. *Z Rheumatol* 2013; 72(10):948–53.
8. Kuhn A, Bonsmann G, Anders H-J, Herzer P, Tenbrock K, Schneider M. The Diagnosis and Treatment of Systemic Lupus Erythematosus. *Dtsch Arztebl Int* 2015; 112(25):423–32.
9. Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P et al. Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. *Medicine (Baltimore)* 1993; 72(2):113–24.
10. Bertsias GK, Tektonidou M, Amoura Z, Aringer M, Bajema I, Berden JHM et al. Joint European League Against Rheumatism and European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association (EULAR/ERA-EDTA) recommendations for the management of adult and paediatric lupus nephritis. *Ann Rheum Dis* 2012; 71(11):1771–82.
11. Bertsias G, Cervera R, Boumpas DT. Systemic Lupus Erythematosus: Pathogenesis and Clinical Features. *EULAR textbook on rheumatic diseases* 2012:476–505.
12. Lipsky PE. Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nat Immunol* 2001; 2(9):764–6.
13. Mitchison NA, Wedderburn LR. B cells in autoimmunity. *PNAS* 2000; (16):8750–1.
14. Drury AN, Szent-Gyorgyi A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *The Journal of Physiology* 1929:213–37.
15. Olsson RA, Pearson JD. Cardiovascular purinoceptors 1990; (3):Physiological Reviews.
16. Dunwiddie TV, Masino SA. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24:31–55.
17. Berne RM. The role of adenosine in the regulation of coronary blood flow. *Circulation Research* 1980; (47):807–13.
18. Merighi S, Mirandola P, Varani K, Gessi S, Leung E, Baraldi PG et al. A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy. *Pharmacology & Therapeutics* 2003; 100(1):31–48.

19. Schulte G. Adenosin, Adenosinrezeptoren und adenosinrezeptoraktivierte Signalwege. *BIOSpektrum* 2004; 10:159–61.
20. Horenstein AL, Chillemi A, Zini R, Quarona V, Bianchi N, Manfredini R et al. Cytokine-Induced Killer Cells Express CD39, CD38, CD203a, CD73 Ectoenzymes and P1 Adenosinergic Receptors. *Front Pharmacol* 2018; 9:196.
21. Rudolph KA, Schubert P, Parkinson FE, Fredholm BB. Adenosine and brain ischemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1992; 4(4):346–69.
22. Latini S, Bordoni F, Pedata F, Corradetti R. Extracellular adenosine concentrations during in vitro ischaemia in rat hippocampal slices. *Br J Pharmacol* 1999; 127(3):729–39.
23. Hauber W. Adenosin: ein Purinnukleosid mit neuromodulatorischen Wirkungen. *e-Neuroforum* 2002; 8(3).
24. Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 2001; 53(4):527–52.
25. Ballarín M, Fredholm BB, Ambrosio S, Mahy N. Extracellular levels of adenosine and its metabolites in the striatum of awake rats: inhibition of uptake and metabolism. *Acta Physiol Scand* 1991; 142(1):97–103.
26. Williams TC, Jarvis SM. Multiple sodium-dependent nucleoside transport systems in bovine renal brush-border membrane vesicles. *Biochem J* 1991; 274 (Pt 1):27–33.
27. Anderson CM, Xiong W, Young JD, Cass CE, Parkinson FE. Demonstration of the existence of mRNAs encoding N1/cif and N2/cit sodium/nucleoside cotransporters in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1996; 42(2):358–61.
28. Baldwin SA, Mackey JR, Cass CE, Young JD. Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. *Mol Med Today* 1999; 5(5):216–24.
29. Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci* 2009; 32(1):19–29.
30. Junger WG. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol* 2011; 11(3):201–12.
31. Bours MJL, Swennen ELR, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 2006; 112(2):358–404.
32. Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF et al. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 2009; 461(7261):282–6.
33. Trautmann A. Extracellular ATP in the immune system: more than just a "danger signal". *Sci Signal* 2009; 2(56):pe6.
34. Padeh S, Cohen A, Roifman CM. ATP-induced activation of human B lymphocytes via P2-purinoceptors. *J Immunol* 1991; 146(5):1626–32.
35. Sakowicz-Burkiewicz M, Kocbuch K, Grden M, Szutowicz A, Pawelczyk T. Adenosine 5'-triphosphate is the predominant source of peripheral adenosine in human B lymphoblasts. *J Physiol Pharmacol* 2010; 61(4):491–9.

36. Brundege JM, Diao L, Proctor WR, Dunwiddie TV. The role of cyclic AMP as a precursor of extracellular adenosine in the rat hippocampus. *Neuropharmacology* 1997; 36(9):1201–10.
37. Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783(5):673–94.
38. Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000; 362(4-5):299–309.
39. Schubert P, Komp W, Kreutzberg GW. Correlation of 5'-nucleotidase activity and selective transneuronal transfer of adenosine in the hippocampus. *Brain Res* 1979; 168(2):419–24.
40. Zimmermann H, Braun N, Kegel B, Heine P. New insights into molecular structure and function of ectonucleotidases in the nervous system. *Neurochem Int* 1998; 32(5-6):421–5.
41. Burnstock G. Unresolved issues and controversies in purinergic signalling. *J Physiol* 2008; 586(14):3307–12.
42. Corriden R, Insel PA. Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation. *Sci Signal* 2010; 3(104):re1.
43. Antonioli L, Csóka B, Fornai M, Colucci R, Kókai E, Blandizzi C et al. Adenosine and inflammation: what's new on the horizon? *Drug Discov Today* 2014; 19(8):1051–68.
44. Broch OJ, Ueland PM. Regional and subcellular distribution of S-adenosylhomocysteine hydrolase in the adult rat brain. *J Neurochem* 1980; 35(2):484–8.
45. Antonioli L, Fornai M, Colucci R, Ghisu N, Tuccori M, Del Tacca M et al. Pharmacological modulation of adenosine system: novel options for treatment of inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14(4):566–74.
46. Arch JR, Newsholme EA. The control of the metabolism and the hormonal role of adenosine. *Essays Biochem* 1978; 14:82–123.
47. Lloyd HG, Fredholm BB. Involvement of adenosine deaminase and adenosine kinase in regulating extracellular adenosine concentration in rat hippocampal slices. *Neurochem Int* 1995; 26(4):387–95.
48. Fredholm BB, Chern Y, Franco R, Sitkovsky M. Aspects of the general biology of adenosine A2A signaling. *Prog Neurobiol* 2007; 83(5):263–76.
49. Haskó G. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends in Immunology* 2004; 25(1):33–9.
50. Sychala J, Datta NS, Takabayashi K, Datta M, Fox IH, Gribbin T et al. Cloning of human adenosine kinase cDNA: sequence similarity to microbial ribokinases and fructokinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(3):1232–7.
51. van Calker D, Müller M, Hamprecht B. ADENOSINE REGULATES VIA TWO DIFFERENT TYPES OF RECEPTORS, THE ACCUMULATION OF CYCLIC AMP IN CULTURED BRAIN CELLS. *J Neurochem* 1979; 33(5):999–1005.
52. Londos C, Cooper DM, Wolff J. Subclasses of external adenosine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77(5):2551–4.
53. Bruns RF, Lu GH, Pugsley TA. Characterization of the A2 adenosine receptor labeled by 3HNECA in rat striatal membranes. *Mol Pharmacol* 1986; 29(4):331–46.
54. Sajjadi FG, Firestein GS. cDNA cloning and sequence analysis of the human A3 adenosine receptor. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1179(1):105–7.

55. Salvatore CA, Jacobson MA, Taylor HE, Linden J, Johnson RG. Molecular cloning and characterization of the human A₃ adenosine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(21):10365–9.
56. Linden J. Cloned adenosine A₃ receptors: pharmacological properties, species differences and receptor functions. *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15(8):298–306.
57. Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA et al. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* 1994; 46(2):143–56.
58. Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Dubyak GR, Harden TK, Jacobson KA et al. Towards a revised nomenclature for P₁ and P₂ receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1997; 18(3):79–82.
59. Jin X, Shepherd RK, Duling BR, Linden J. Inosine binds to A₃ adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation. *J Clin Invest* 1997; 100(11):2849–57.
60. Fredholm BB, Irenius E, Kull B, Schulte G. Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Pharmacol* 2001; 61(4):443–8.
61. Cronstein BN, Levin RI, Philips M, Hirschhorn R, Abramson SB, Weissmann G. Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A₁ receptors and inhibited via adenosine A₂ receptors. *J Immunol* 1992; 148(7):2201–6.
62. Bouma MG, Jeunhomme TM, Boyle DL, Dentener MA, Voitenok NN, van den Wildenberg FA et al. Adenosine inhibits neutrophil degranulation in activated human whole blood: involvement of adenosine A₂ and A₃ receptors. *J Immunol* 1997; 158(11):5400–8.
63. Faure M, Voyno-Yasenetskaya TA, Bourne HR. cAMP and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells. *J Biol Chem* 1994; 269(11):7851–4.
64. Eltzschig HK, Sitkovsky MV, Robson SC. Purinergic signaling during inflammation. *N Engl J Med* 2012; 367(24):2322–33.
65. Koeppen M, Eckle T, Eltzschig HK. Selective deletion of the A₁ adenosine receptor abolishes heart-rate slowing effects of intravascular adenosine in vivo. *PLoS One* 2009; 4(8):e6784.
66. Koscsó B, Csóka B, Pacher P, Haskó G. Investigational A₃ adenosine receptor targeting agents. *Expert Opin Investig Drugs* 2011; 20(6):757–68.
67. Zhou QY, Li C, Olah ME, Johnson RA, Stiles GL, Civelli O. Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A₃ adenosine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(16):7432–6.
68. Schulte G, Fredholm BB. Human adenosine A₁(1), A₂(A), A₂(B), and A₃ receptors expressed in Chinese hamster ovary cells all mediate the phosphorylation of extracellular-regulated kinase 1/2. *Mol Pharmacol* 2000; 58(3):477–82.
69. Mitchell CH, Peterson-Yantorno K, Carré DA, McGlenn AM, Coca-Prados M, Stone RA et al. A₃ adenosine receptors regulate Cl⁻ channels of nonpigmented ciliary epithelial cells. *Am J Physiol* 1999; 276(3):C659–66.
70. Németh ZH, Leibovich SJ, Deitch EA, Sperlách B, Virág L, Vizi ES et al. Adenosine stimulates CREB activation in macrophages via a p38 MAPK-mediated mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; 312(4):883–8.

71. Csóka B, Németh ZH, Virág L, Gergely P, Leibovich SJ, Pacher P et al. A2A adenosine receptors and C/EBPbeta are crucially required for IL-10 production by macrophages exposed to *Escherichia coli*. *Blood* 2007; 110(7):2685–95.
72. Haskó G, Pacher P. A2A receptors in inflammation and injury: lessons learned from transgenic animals. *J Leukoc Biol* 2008; 83(3):447–55.
73. Cronstein BN, Daguma L, Nichols D, Hutchison AJ, Williams M. The adenosine/neutrophil paradox resolved: human neutrophils possess both A1 and A2 receptors that promote chemotaxis and inhibit O₂ generation, respectively. *J Clin Invest* 1990; 85(4):1150–7.
74. Ohta A, Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 2001; 414(6866):916–20.
75. Fredholm BB. Adenosine and neuroprotection. *Int Rev Neurobiol* 1997; 40:259–80.
76. Fredholm BB. Purines and neutrophil leukocytes. *Gen Pharmacol* 1997; 28(3):345–50.
77. Sullivan GW, Rieger JM, Scheld WM, Macdonald TL, Linden J. Cyclic AMP-dependent inhibition of human neutrophil oxidative activity by substituted 2-propynylcyclohexyl adenosine A(2A) receptor agonists. *Br J Pharmacol* 2001; 132(5):1017–26.
78. Boison D, Chen J-F, Fredholm BB. Adenosine signaling and function in glial cells. *Cell Death Differ* 2010; 17(7):1071–82.
79. Feoktistov I, Biaggioni I. Role of adenosine A(2B) receptors in inflammation. *Adv Pharmacol* 2011; 61:115–44.
80. Eckle T, Krahn T, Grenz A, Köhler D, Mittelbronn M, Ledent C et al. Cardioprotection by ecto-5'-nucleotidase (CD73) and A2B adenosine receptors. *Circulation* 2007; 115(12):1581–90.
81. Eckle T, Grenz A, Laucher S, Eltzschig HK. A2B adenosine receptor signaling attenuates acute lung injury by enhancing alveolar fluid clearance in mice. *J Clin Invest* 2008; 118(10):3301–15.
82. Eckle T, Köhler D, Lehmann R, El Kasmi K, Eltzschig HK. Hypoxia-inducible factor-1 is central to cardioprotection: a new paradigm for ischemic preconditioning. *Circulation* 2008; 118(2):166–75.
83. Rosenberger P, Schwab JM, Mirakaj V, Masekowsky E, Mager A, Morote-Garcia JC et al. Hypoxia-inducible factor-dependent induction of netrin-1 dampens inflammation caused by hypoxia. *Nat Immunol* 2009; 10(2):195–202.
84. Grenz A, Osswald H, Eckle T, Yang D, Zhang H, Tran ZV et al. The reno-vascular A2B adenosine receptor protects the kidney from ischemia. *PLoS Med* 2008; 5(6):e137.
85. Grenz A, Bauerle JD, Dalton JH, Ridyard D, Badulak A, Tak E et al. Equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) regulates postischemic blood flow during acute kidney injury in mice. *J Clin Invest* 2012; 122(2):693–710.
86. Wallace KL, Linden J. Adenosine A2A receptors induced on iNKT and NK cells reduce pulmonary inflammation and injury in mice with sickle cell disease. *Blood* 2010; 116(23):5010–20.
87. Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2006; 2(2):409–30.
88. Lüthje J. Origin, metabolism and function of extracellular adenine nucleotides in the blood. *Klin Wochenschr* 1989; 67(6):317–27.
89. Burnstock G, Knight GE. Cellular Distribution and Functions of P2 Receptor Subtypes in Different Systems. In: Elsevier; 2004. p. 31–304 (International Review of Cytology).

90. Sperlágh B, Vizi ES. The Role of Extracellular Adenosine in Chemical Neurotransmission in the Hippocampus and Basal Ganglia: Pharmacological and Clinical Aspects. *Curr Top Med Chem* 2011; 11(8):1034–46.
91. Sperlágh B. ATP released by LPS increases nitric oxide production in raw 264.7 macrophage cell line via P2Z · P2X7 receptors. *Neurochemistry International* 1998; 33(3):209–15.
92. Sperlágh B, Baranyi M, Haskó G, Vizi ES. Potent effect of interleukin-1 beta to evoke ATP and adenosine release from rat hippocampal slices. *J Neuroimmunol* 2004; 151(1-2):33–9.
93. Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal* 2012; 8(3):437–502.
94. Goding JW. Ecto-enzymes: physiology meets pathology. *J Leukoc Biol* 2000; 67(3):285–311.
95. Sreer PA. Why are enzymes so big? *Trends Biochem Sci* 1984; 9(9):387–90.
96. Kenny AJ, editor. *Mammalian ectoenzymes*. Amsterdam: Elsevier; 1987. (Research monographs in cell and tissue physiology; vol 14).
97. Horenstein AL, Chillemi A, Zaccarello G, Bruzzone S, Quarona V, Zito A et al. A CD38/CD203a/CD73 ectoenzymatic pathway independent of CD39 drives a novel adenosinergic loop in human T lymphocytes. *Oncoimmunology* 2013; 2(9):e26246.
98. Goding JW, Howard MC. Ecto-enzymes of lymphoid cells. *Immunol Rev* 1998; 161:5–10.
99. Morley DJ, Hawley DM, Ulbright TM, Butler LG, Culp JS, Hodes ME. Distribution of phosphodiesterase I in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 1987; 35(1):75–82.
100. Harahap AR, Goding JW. Distribution of the murine plasma cell antigen PC-1 in non-lymphoid tissues. *J Immunol* 1988; 141(7):2317–20.
101. Serra S, Horenstein AL, Vaisitti T, Brusa D, Rossi D, Laurenti L et al. CD73-generated extracellular adenosine in chronic lymphocytic leukemia creates local conditions counteracting drug-induced cell death. *Blood* 2011; 118(23):6141–52.
102. Sträter N. Ecto-5'-nucleotidase: Structure function relationships. *Purinergic Signal* 2006; 2(2):343–50.
103. Malavasi F, Funaro A, Roggero S, Horenstein A, Calosso L, Mehta K. Human CD38: a glycoprotein in search of a function. *Immunol Today* 1994; 15(3):95–7.
104. Goding JW, Terkeltaub R, Maurice M, Deterre P, Sali A, Belli SI. Ecto-phosphodiesterase/pyrophosphatase of lymphocytes and non-lymphoid cells: structure and function of the PC-1 family. *Immunol Rev* 1998; 161:11–26.
105. Katada T, Kontani K, Wada T, Hosoda N, Hoshino S, Nishina H. Enzymic and signal transduction properties of CD38/NADase and PC-1/phosphodiesterase. *Chem Immunol* 2000; 75:60–78.
106. Hubert S, Rissiek B, Klages K, Huehn J, Sparwasser T, Haag F et al. Extracellular NAD⁺ shapes the Foxp3⁺ regulatory T cell compartment through the ART2-P2X7 pathway. *J Exp Med* 2010; 207(12):2561–8.
107. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med* 2013; 19(6):355–67.
108. Ramakers BP, Wever KE, Kox M, van den Broek PH, Mbuyi F, Rongen G et al. How systemic inflammation modulates adenosine metabolism and adenosine receptor expression in humans in vivo. *Crit Care Med* 2012; 40(9):2609–16.

109. Kammer GM, Birch RE, Polmar SH. Impaired immunoregulation in systemic lupus erythematosus: defective adenosine-induced suppressor T lymphocyte generation. *The Journal of Immunology* 1983; 130(4):1706–12.
110. Mandler R, Birch RE, Polmar SH, Kammer GM, Rudolph SA. Abnormal adenosine-induced immunosuppression and cAMP metabolism in T lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79(23):7542–6.
111. Schultz LA, Kammer GM, Rudolph SA. Characterization of the human T lymphocyte adenosine receptor: comparison of normal and systemic lupus erythematosus cells. *FASEB J* 1988; 2(3):244–50.
112. Stolk JN, Koning DG de, Pennings AH, Abreu RA de, van de Putte LB, Boerbooms AM. Reduced purine 5'-nucleotidase activity in lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus: results of a pilot study. *Ann Rheum Dis* 1999; 58(2):122–5.
113. Di Virgilio F, Giuliani AL. Purinergic signalling in autoimmunity: A role for the P2X7R in systemic lupus erythematosus? *Biomed J* 2016; 39(5):326–38.
114. Bortoluzzi A, Vincenzi F, Govoni M, Padovan M, Ravani A, Borea PA et al. A2A adenosine receptor upregulation correlates with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2016; 18:192.
115. 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* 2013; 122(1):9–18.
116. Vences-Catalán F, Santos-Argumedo L. CD38 through the life of a murine B lymphocyte. *IUBMB Life* 2011; 63(10):840–6.
117. Barclay AN. *The leucocyte antigen factsbook*. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 2010. (Factsbook series). Available from: URL: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=212287>.
118. Yegutkin GG, Wieringa B, Robson SC, Jalkanen S. Metabolism of circulating ADP in the bloodstream is mediated via integrated actions of soluble adenylate kinase-1 and NTPDase1/CD39 activities. *FASEB J* 2012; 26(9):3875–83.
119. al-Rashida M, Iqbal J. Therapeutic potentials of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase, ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase, ecto-5'-nucleotidase, and alkaline phosphatase inhibitors. *Med Res Rev* 2014; 34(4):703–43.
120. Maliszewski CR, Delespesse GJ, Schoenborn MA, Armitage RJ, Fanslow WC, Nakajima T et al. The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. *The Journal of Immunology* 1994; 153(8):3574–83.
121. Heine P, Braun N, Sévigny J, Robson SC, Servos J, Zimmermann H. The C-terminal cysteine-rich region dictates specific catalytic properties in chimeras of the ectonucleotidases NTPDase1 and NTPDase2. *Eur J Biochem* 2001; 268(2):364–73.
122. Smith TM, Kirley TL. Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases1. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1386(1):65–78.
123. Dwyer KM, Deaglio S, Gao W, Friedman D, Strom TB, Robson SC. CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signal* 2007; 3(1-2):171–80.
124. Kansas GS, Wood GS, Tedder TF. Expression, distribution, and biochemistry of human CD39. Role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes. *J Immunol* 1991; 146(7):2235–44.

125. Enjyoji K, Sévigny J, Lin Y, Frenette PS, Christie PD, Esch JS et al. Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nat Med* 1999; 5(9):1010–7.
126. Kapojos JJ, van den Berg A, Borghuis T, Banas B, Huitema S, Poelstra K et al. Enhanced ecto-apyrase activity of stimulated endothelial or mesangial cells is downregulated by glucocorticoids in vitro. *Eur J Pharmacol* 2004; 501(1-3):191–8.
127. Mizumoto N, Kumamoto T, Robson SC, Sévigny J, Matsue H, Enjyoji K et al. CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. *Nat Med* 2002; 8(4):358–65.
128. Zimmermann H. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. *Trends Pharmacol Sci* 1999; 20(6):231–6.
129. Robson SC, Wu Y, Sun X, Knosalla C, Dwyer K, Enjyoji K. Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. *Semin Thromb Hemost* 2005; 31(2):217–33.
130. Deaglio S, Robson SC. Ectonucleotidases as regulators of purinergic signaling in thrombosis, inflammation, and immunity. *Adv Pharmacol* 2011; 61:301–32.
131. Eltzschig HK, Köhler D, Eckle T, Kong T, Robson SC, Colgan SP. Central role of Sp1-regulated CD39 in hypoxia/ischemia protection. *Blood* 2009; 113(1):224–32.
132. Robson SC, Enjyoji K, Goepfert C, Imai M, Kaczmarek E, Lin Y et al. Modulation of extracellular nucleotide-mediated signaling by CD39/nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1. *Drug Dev Res* 2001; 53(2-3):193–207.
133. Eltzschig HK, Ibla JC, Furuta GT, Leonard MO, Jacobson KA, Enjyoji K et al. Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. *J Exp Med* 2003; 198(5):783–96.
134. Chalmin F, Mignot G, Bruchard M, Chevriaux A, Végran F, Hichami A et al. Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity* 2012; 36(3):362–73.
135. Bastid J, Cottalorda-Regairaz A, Alberici G, Bonnefoy N, Eliaou J-F, Bensussan A. ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. *Oncogene* 2013; 32(14):1743–51.
136. Robson SC, Kaczmarek E, Siegel JB, Candinas D, Koziak K, Millan M et al. Loss of ATP diphosphohydrolase activity with endothelial cell activation. *J Exp Med* 1997; 185(1):153–63.
137. Koyamada N, Miyatake T, Candinas D, Hechenleitner P, Siegel J, Hancock WW et al. Apyrase administration prolongs discordant xenograft survival. *Transplantation* 1996; 62(12):1739–43.
138. Koonin EV. Conserved sequence pattern in a wide variety of phosphoesterases. *Protein Sci* 1994; 3(2):356–8.
139. Fini C, Thuong VD, Aliante M, Floridi A, Cannistraro S. Reconstitution of 5'-nucleotidase of bull seminal plasma in spin-labeled liposomes. *J Membr Biol* 1994; 142(1):137–44.
140. Heuts DPHM, Weissenborn MJ, Olkhov RV, Shaw AM, Gummadova J, Levy C et al. Crystal structure of a soluble form of human CD73 with ecto-5'-nucleotidase activity. *Chembiochem* 2012; 13(16):2384–91.
141. Klemens MR, Sherman WR, Holmberg NJ, Ruedi JM, Low MG, Thompson LF. Characterization of soluble vs membrane-bound human placental 5'-nucleotidase. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 172(3):1371–7.

142. Fini C, Talamo F, Cherri S, Coli M, Floridi A, Ferrara L et al. Biochemical and mass spectrometric characterization of soluble ecto-5'-nucleotidase from bull seminal plasma. *Biochem J* 2003; 372(Pt 2):443–51.
143. Ogata S, Hayashi Y, Misumi Y, Ikehara Y. Membrane-anchoring domain of rat liver 5'-nucleotidase: identification of the COOH-terminal serine-523 covalently attached with a glycolipid. *Biochemistry* 1990; 29(34):7923–7.
144. Fini C, Palmerini CA, Damiani P, Stochaj U, Mannherz HG, Floridi A. 5'-Nucleotidase from bull seminal plasma, chicken gizzard and snake venom is a zinc metalloprotein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1990; 1038(1):18–22.
145. Knapp K, Zebisch M, Pippel J, El-Tayeb A, Müller CE, Sträter N. Crystal structure of the human ecto-5'-nucleotidase (CD73): insights into the regulation of purinergic signaling. *Structure* 2012; 20(12):2161–73.
146. Resta R, Yamashita Y, Thompson LF. Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol Rev* 1998; 161:95–109.
147. Lennon PF, Taylor CT, Stahl GL, Colgan SP. Neutrophil-derived 5'-adenosine monophosphate promotes endothelial barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A2B receptor activation. *J Exp Med* 1998; 188(8):1433–43.
148. Thompson LF, Eltzschig HK, Ibla JC, van de Wiele CJ, Resta R, Morote-Garcia JC et al. Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J Exp Med* 2004; 200(11):1395–405.
149. Beavis PA, Stagg J, Darcy PK, Smyth MJ. CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends in Immunology* 2012; 33(5):231–7.
150. Regateiro FS, Howie D, Nolan KF, Agorogiannis EI, Greaves DR, Cobbold SP et al. Generation of anti-inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGF- β . *Eur J Immunol* 2011; 41(10):2955–65.
151. Schetinger MRC, Morsch VM, Bonan CD, Wyse ATS. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. *Biofactors* 2007; 31(2):77–98.
152. Nikolova M, Carriere M, Jenabian M-A, Limou S, Younas M, Kök A et al. CD39/adenosine pathway is involved in AIDS progression. *PLoS Pathog* 2011; 7(7):e1002110.
153. Bönner F, Borg N, Burghoff S, Schrader J. Resident cardiac immune cells and expression of the ectonucleotidase enzymes CD39 and CD73 after ischemic injury. *PLoS ONE* 2012; 7(4):e34730.
154. Zhang B. CD73 promotes tumor growth and metastasis. *Oncoimmunology* 2012; 1(1):67–70.
155. Stefan C, Jansen S, Bollen M. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends Biochem Sci* 2005; 30(10):542–50.
156. Bollen M, Gijssbers R, Ceulemans H, Stalmans W, Stefan C. Nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases on the move. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2000; 35(6):393–432.
157. Iqbal J, Lévesque SA, Sévigny J, Müller CE. A highly sensitive CE-UV method with dynamic coating of silica-fused capillaries for monitoring of nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase reactions. *Electrophoresis* 2008; 29(17):3685–93.
158. Goding JW, Grobden B, Slegers H. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2003; 1638(1):1–19.

159. Lund FE, Cockayne DA, Randall TD, Solvason N, Schuber F, Howard MC. CD38: a new paradigm in lymphocyte activation and signal transduction. *Immunol Rev* 1998; 161:79–93.
160. al-Rashida M, Iqbal J. Inhibition of alkaline phosphatase: an emerging new drug target. *Mini Rev Med Chem* 2015; 15(1):41–51.
161. Millán JL. *Mammalian Alkaline Phosphatases*. Wiley; 2006.
162. Roig MG, Burguillo FJ, Del Arco A, Usero JL, Izquierdo C, Herraez MA. Kinetic studies of the transphosphorylation reactions catalyzed by alkaline phosphatase from *E. coli*: Hydrolysis of p-nitrophenyl phosphate and o-carboxyphenyl phosphate in presence of tris. *Int J Biochem* 1982; 14(7):655–66.
163. Hall AD, Williams A. Leaving group dependence in the phosphorylation of *Escherichia coli* alkaline phosphatase by monophosphate esters. *Biochemistry* 1986; 25(17):4784–90.
164. Sidique S, Ardecky R, Su Y, Narisawa S, Brown B, Millán JL et al. Design and synthesis of pyrazole derivatives as potent and selective inhibitors of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP). *Bioorg Med Chem Lett* 2009; 19(1):222–5.
165. Kihn L, Rutkowski D, Stinson RA. Incorporation of human liver and placental alkaline phosphatases into liposomes and membranes is via phosphatidylinositol. *Biochem Cell Biol* 1990; 68(9):1112–8.
166. Lansley SM, Searles RG, Hoi A, Thomas C, Moneta H, Herrick SE et al. Mesothelial cell differentiation into osteoblast- and adipocyte-like cells. *J Cell Mol Med* 2011; 15(10):2095–105.
167. Shafiee A, Seyedjafari E, Soleimani M, Ahmadbeigi N, Dinarvand P, Ghaemi N. A comparison between osteogenic differentiation of human unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Biotechnol Lett* 2011; 33(6):1257–64.
168. Ali AT, Penny CB, Paiker JE, Psaras G, Ikram F, Crowther NJ. The effect of alkaline phosphatase inhibitors on intracellular lipid accumulation in preadipocytes isolated from human mammary tissue. *Ann Clin Biochem* 2006; 43(Pt 3):207–13.
169. Ali AT, Penny CB, Paiker JE, Psaras G, Ikram F, Crowther NJ. The relationship between alkaline phosphatase activity and intracellular lipid accumulation in murine 3T3-L1 cells and human preadipocytes. *Anal Biochem* 2006; 354(2):247–54.
170. Narisawa S, Fröhlander N, Millán JL. Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. *Dev Dyn* 1997; 208(3):432–46.
171. Khodaparast-Sharifi SH, Dale Snow L. Levamisole inhibition of alkaline phosphatase and 5'-nucleotidase of bovine milk fat globule membranes. *Int J Biochem* 1989; 21(4):401–5.
172. Sánchez de Medina F, Martínez-Augustin O, González R, Ballester I, Nieto A, Gálvez J et al. Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: a novel pharmacological target for inflammatory bowel disease. *Biochem Pharmacol* 2004; 68(12):2317–26.
173. Kaisho T, Ishikawa J, Oritani K, Inazawa J, Tomizawa H, Muraoka O et al. BST-1, a surface molecule of bone marrow stromal cell lines that facilitates pre-B-cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(12):5325–9.
174. Hirata Y, Kimura N, Sato K, Ohsugi Y, Takasawa S, Okamoto H et al. ADP ribosyl cyclase activity of a novel bone marrow stromal cell surface molecule, BST-1. *FEBS Lett* 1994; 356(2-3):244–8.

175. Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, Ferrero E, Horenstein AL, Ortolan E et al. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev* 2008; 88(3):841–86.
176. Ishihara K, Hirano T. BST-1/CD157 regulates the humoral immune responses in vivo. *Chem Immunol* 2000; 75:235–55.
177. Quarona V, Zaccarello G, Chillemi A, Brunetti E, Singh VK, Ferrero E et al. CD38 and CD157: a long journey from activation markers to multifunctional molecules. *Cytometry B Clin Cytom* 2013; 84(4):207–17.
178. Funaro A, Ortolan E, Ferranti B, Gargiulo L, Notaro R, Luzzatto L et al. CD157 is an important mediator of neutrophil adhesion and migration. *Blood* 2004; 104(13):4269–78.
179. Ortolan E, Tibaldi EV, Ferranti B, Lavagno L, Garbarino G, Notaro R et al. CD157 plays a pivotal role in neutrophil transendothelial migration. *Blood* 2006; 108(13):4214–22.
180. Ortolan E, Vacca P, Capobianco A, Armando E, Crivellin F, Horenstein A et al. CD157, the Janus of CD38 but with a unique personality. *Cell Biochem Funct* 2002; 20(4):309–22.
181. Hernández-Campo PM, Almeida J, Sánchez ML, Malvezzi M, Orfao A. Normal patterns of expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins on different subsets of peripheral blood cells: a frame of reference for the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry B Clin Cytom* 2006; 70(2):71–81.
182. Ghannadan M, Baghestanian M, Wimazal F, Eisenmenger M, Latal D, Kargül G et al. Phenotypic characterization of human skin mast cells by combined staining with toluidine blue and CD antibodies. *J Invest Dermatol* 1998; 111(4):689–95.
183. Ross JA, Ansell I, Hjelle JT, Anderson JD, Miller-Hjelle MA, Dobbie JW. Phenotypic mapping of human mesothelial cells. *Adv Perit Dial* 1998; 14:25–30.
184. Shimaoka Y, Attrep JF, Hirano T, Ishihara K, Suzuki R, Toyosaki T et al. Nurse-like cells from bone marrow and synovium of patients with rheumatoid arthritis promote survival and enhance function of human B cells. *J Clin Invest* 1998; 102(3):606–18.
185. Wimazal F, Ghannadan M, Müller MR, End A, Willheim M, Meidlinger P et al. Expression of homing receptors and related molecules on human mast cells and basophils: a comparative analysis using multi-color flow cytometry and toluidine blue/immunofluorescence staining techniques. *Tissue Antigens* 1999; 54(5):499–507.
186. Lavagno L, Ferrero E, Ortolan E, Malavasi F, Funaro A. CD157 is part of a supramolecular complex with CD11b/CD18 on the human neutrophil cell surface. *J Biol Regul Homeost Agents* 2007; 21(1-2):5–11.
187. van der Weyden MB, Kelley WN. Human adenosine deaminase. Distribution and properties. *J Biol Chem* 1976; 251(18):5448–56.
188. Ciruela F, Saura C, Canela EI, Mallol J, Lluís C, Franco R. Adenosine deaminase affects ligand-induced signalling by interacting with cell surface adenosine receptors. *FEBS Lett* 1996; 380(3):219–23.
189. Gracia E, Cortés A, Meana JJ, García-Sevilla J, Herhsfield MS, Canela EI et al. Human adenosine deaminase as an allosteric modulator of human A(1) adenosine receptor: abolishment of negative cooperativity for H(R)-p1a binding to the caudate nucleus. *J Neurochem* 2008; 107(1):161–70.

190. Herrera C, Casadó V, Ciruela F, Schofield P, Mallol J, Lluís C et al. Adenosine A₂B Receptors Behave as an Alternative Anchoring Protein for Cell Surface Adenosine Deaminase in Lymphocytes and Cultured Cells. *Mol Pharmacol* 2001; 59(1):127–34.
191. Saura CA, Mallol J, Canela EI, Lluís C, Franco R. Adenosine deaminase and A₁ adenosine receptors internalize together following agonist-induced receptor desensitization. *J Biol Chem* 1998; 273(28):17610–7.
192. Saura C, Ciruela F, Casadó V, Canela EI, Mallol J, Lluís C et al. Adenosine deaminase interacts with A₁ adenosine receptors in pig brain cortical membranes. *J Neurochem* 1996; 66(4):1675–82.
193. Sun W-C, Cao Y, Jin L, Wang L-Z, Meng F, Zhu X-Z. Modulating effect of adenosine deaminase on function of adenosine A₁ receptors. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26(2):160–5.
194. Franco R, Valenzuela A, Lluís C, Blanco J. Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. *Immunol Rev* 1998; 161:27–42.
195. Cristalli G, Costanzi S, Lambertucci C, Lupidi G, Vittori S, Volpini R et al. Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors. *Med Res Rev* 2001; 21(2):105–28.
196. Kameoka J, Tanaka T, Nojima Y, Schlossman SF, Morimoto C. Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. *Science* 1993; 261(5120):466–9.
197. Herrera C, Casadó V, Ciruela F, Schofield P, Mallol J, Lluís C et al. Adenosine A₂B receptors behave as an alternative anchoring protein for cell surface adenosine deaminase in lymphocytes and cultured cells. *Mol Pharmacol* 2001; 59(1):127–34.
198. Franco R, Pacheco R, Gatell JM, Gallart T, Lluís C. Enzymatic and extraenzymatic role of adenosine deaminase 1 in T-cell-dendritic cell contacts and in alterations of the immune function. *Crit Rev Immunol* 2007; 27(6):495–509.
199. Zavalov AV, Gracia E, Glaichenhaus N, Franco R, Zavalov AV, Lauvau G. Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes into macrophages and stimulates proliferation of T helper cells and macrophages. *J Leukoc Biol* 2010; 88(2):279–90.
200. Apasov SG, Blackburn MR, Kellems RE, Smith PT, Sitkovsky MV. Adenosine deaminase deficiency increases thymic apoptosis and causes defective T cell receptor signaling. *J Clin Invest* 2001; 108(1):131–41.
201. Apasov SG, Sitkovsky MV. The extracellular versus intracellular mechanisms of inhibition of TCR-triggered activation in thymocytes by adenosine under conditions of inhibited adenosine deaminase. *Int Immunol* 1999; 11(2):179–89.
202. Ghodke-Puranik Y, Dorschner JM, Vsetecka DM, Amin S, Makol A, Ernste F et al. Lupus-Associated Functional Polymorphism in PNP Causes Cell Cycle Abnormalities and Interferon Pathway Activation in Human Immune Cells. *Arthritis Rheumatol* 2017; 69(12):2328–37.
203. Markert ML. Purine nucleoside phosphorylase deficiency. *Immunodeficiency Rev* 1991; 3(1):45–81.
204. Alangari A, Al-Harbi A, Al-Ghoniem A, Santisteban I, Hershfield M. Purine nucleoside phosphorylase deficiency in two unrelated Saudi patients. *Ann Saudi Med* 2009; 29(4):309–12.
205. Hershfield MS. IMMUNODEFICIENCY CAUSED BY ADENOSINE DEAMINASE DEFICIENCY. *Immunol Allergy Clin North Am* 2000; 20(1):161–75.
206. Sasaki Y, Iseki M, Yamaguchi S, Kurosawa Y, Yamamoto T, Moriwaki Y et al. Direct evidence of autosomal recessive inheritance of Arg24 to termination codon in purine nucleoside phosphorylase gene in a family with a severe combined immunodeficiency patient. *Hum Genet* 1998; 103(1):81–5.

207. Murphy KP, Travers P, Walport M, Ehrenstein M. Janeway Immunologie. 7. Aufl., korrig. Nachdr. Berlin: Springer Spektrum; 2014.
208. Fulcher DA, Basten A. B cell life span: a review. *Immunol Cell Biol* 1997; 75(5):446–55.
209. MacLennan IC, Liu YJ, Johnson GD. Maturation and dispersal of B-cell clones during T cell-dependent antibody responses. *Immunol Rev* 1992; 126:143–61.
210. Zheng B, Han S, Takahashi Y, Kelsoe G. Immunosenescence and germinal center reaction. *Immunol Rev* 1997; 160:63–77.
211. Liu YJ, Arpin C, Bouteiller O de, Guret C, Banchereau J, Martinez-Valdez H et al. Sequential triggering of apoptosis, somatic mutation and isotype switch during germinal center development. *Semin Immunol* 1996; 8(3):169–77.
212. Liu YJ, Banchereau J. Regulation of B-cell commitment to plasma cells or to memory B cells. *Semin Immunol* 1997; 9(4):235–40.
213. Liu YJ, Arpin C. Germinal center development. *Immunol Rev* 1997; 156:111–26.
214. Rajewsky K, Förster I, Cumano A. Evolutionary and somatic selection of the antibody repertoire in the mouse. *Science* 1987; 238(4830):1088–94.
215. Rajewsky K. Burnet's unhappy hybrid. *Nature* 1998; 394(6694):624–5.
216. MacLennan IC, Gulbranson-Judge A, Toellner KM, Casamayor-Palleja M, Chan E, Sze DM et al. The changing preference of T and B cells for partners as T-dependent antibody responses develop. *Immunol Rev* 1997; 156:53–66.
217. Pascual V, Liu YJ, Magalski A, Bouteiller O de, Banchereau J, Capra JD. Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. *J Exp Med* 1994; 180(1):329–39.
218. McDevitt HO. The role of MHC class II molecules in susceptibility and resistance to autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 1998; 10(6):677–81.
219. Panayi GS. Targeting of cells involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 1999; 38 Suppl 2:8–10.
220. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40(9):1725.
221. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25(11):1271–7.
222. Madi L, Cohen S, Ochayin A, Bar-Yehuda S, Barer F, Fishman P. Overexpression of A3 adenosine receptor in peripheral blood mononuclear cells in rheumatoid arthritis: involvement of nuclear factor-kappaB in mediating receptor level. *J Rheumatol* 2007; 34(1):20–6.
223. Ochaion A, Bar-Yehuda S, Cohen S, Barer F, Patoka R, Amital H et al. The anti-inflammatory target A(3) adenosine receptor is over-expressed in rheumatoid arthritis, psoriasis and Crohn's disease. *Cell Immunol* 2009; 258(2):115–22.
224. Dörner T, Jacobi AM, Lee J, Lipsky PE. Abnormalities of B cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol Methods* 2011; 363(2):187–97.
225. Hesse J, Siekierka-Harreis M, Steckel B, Alter C, Schallehn M, Honke N et al. Profound inhibition of CD73-dependent formation of anti-inflammatory adenosine in B cells of SLE patients. *EBioMedicine* 2021; 73:103616.

226. Becker LV, da Silva Pereira Saccol R, Morsch VM, Leal DBR, Casali EA, Lopes NGM et al. Activity and expression of E-NTPDase is altered in peripheral lymphocytes of systemic lupus erythematosus patients. *Clin Chim Acta* 2019; 488:90–7.
227. Malavasi F, Deaglio S, Ferrero E, Funaro A, Sancho J, Ausiello CM et al. CD38 and CD157 as receptors of the immune system: a bridge between innate and adaptive immunity. *Mol Med* 2006; 12(11-12):334–41.
228. Lee BO, Ishihara K, Denno K, Kobune Y, Itoh M, Muraoka O et al. Elevated levels of the soluble form of bone marrow stromal cell antigen 1 in the sera of patients with severe rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996; 39(4):629–37.
229. Ginsburg WW, Finkelman FD, Lipsky PE. Circulating and pokeweed mitogen-induced immunoglobulin-secreting cells in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 1979; 35(1):76–88.
230. Mason LJ, Isenberg DA. 1 Immunopathogenesis of SLE. *Baillieres Clin Rheumatol* 1998; 12(3):385–403.
231. Spronk PE, Horst G, van der Gun BT, Limburg PC, Kallenberg CG. Anti-dsDNA production coincides with concurrent B and T cell activation during development of active disease in systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol* 1996; 104(3):446–53.
232. Spronk PE, vd Gun BT, Limburg PC, Kallenberg CG. B cell activation in clinically quiescent systemic lupus erythematosus (SLE) is related to immunoglobulin levels, but not to levels of anti-dsDNA, nor to concurrent T cell activation. *Clin Exp Immunol* 1993; 93(1):39–44.
233. Bourne T, Zukowska-Cooper M, Salaman MR, Seifert MH, Isenberg DA. Spontaneous immunoglobulin-producing capacity of cultures from lupus patients and normal donors following depletion of cells expressing CD19 or CD38. *Clin Exp Immunol* 1998; 111(3):611–6.
234. Schwab J, Lukowsky A, Volk HD, Peter HH, Melchers I. Precursor frequencies for DNA-specific B lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol* 1994; 96(3):450–7.
235. Rodríguez-Bayona B, Ramos-Amaya A, Pérez-Venegas JJ, Rodríguez C, Brieva JA. Decreased frequency and activated phenotype of blood CD27 IgD IgM B lymphocytes is a permanent abnormality in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Res Ther* 2010; 12(3):R108.
236. Jacobi AM, Odendahl M, Reiter K, Bruns A, Burmester GR, Radbruch A et al. Correlation between circulating CD27^{high} plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2003; 48(5):1332–42.
237. Szabó K, Papp G, Szántó A, Tarr T, Zeher M. A comprehensive investigation on the distribution of circulating follicular T helper cells and B cell subsets in primary Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 2016; 183(1):76–89.
238. Yurasov S, Wardemann H, Hammersen J, Tsuiji M, Meffre E, Pascual V et al. Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 2005; 201(5):703–11.
239. Yurasov S, Tiller T, Tsuiji M, Velinzon K, Pascual V, Wardemann H et al. Persistent expression of autoantibodies in SLE patients in remission. *J Exp Med* 2006; 203(10):2255–61.
240. Jacobi AM, Reiter K, Mackay M, Aranow C, Hiepe F, Radbruch A et al. Activated memory B cell subsets correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus: delineation by expression of CD27, IgD, and CD95. *Arthritis Rheum* 2008; 58(6):1762–73.

241. Wei C, Anolik J, Cappione A, Zheng B, Pugh-Bernard A, Brooks J et al. A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2007; 178(10):6624–33.
242. Nakayamada S, Iwata S, Tanaka Y. Relevance of lymphocyte subsets to B cell-targeted therapy in systemic lupus erythematosus. *Int J Rheum Dis* 2015; 18(2):208–18.
243. Anolik JH, Barnard J, Owen T, Zheng B, Kemshetti S, Looney RJ et al. Delayed memory B cell recovery in peripheral blood and lymphoid tissue in systemic lupus erythematosus after B cell depletion therapy. *Arthritis Rheum* 2007; 56(9):3044–56.
244. Iwata S, Saito K, Tokunaga M, Tanaka Y. Persistent memory B cell down-regulation after 6-year remission induced by rituximab therapy in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2013; 22(5):538–40.
245. Iwata S, Saito K, Tokunaga M, Yamaoka K, Nawata M, Yukawa S et al. Phenotypic changes of lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus who are in longterm remission after B cell depletion therapy with rituximab. *J Rheumatol* 2011; 38(4):633–41.
246. Tokunaga M, Fujii K, Saito K, Nakayamada S, Tsujimura S, Nawata M et al. Down-regulation of CD40 and CD80 on B cells in patients with life-threatening systemic lupus erythematosus after successful treatment with rituximab. *Rheumatology (Oxford)* 2005; 44(2):176–82.
247. Dörner T, Jacobi AM, Lipsky PE. B cells in autoimmunity. *Arthritis Res Ther* 2009; 11(5):247.

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Überblick über die vier verschiedenen Adenosinrezeptoren und ihre weitere Wirkung	(6)
Abbildung 2	Überblick über den Metabolismus von ATP und NAD ⁺ durch die purinerge Enzymkaskade	(8)
Abbildung 3	Überblick über den Metabolismus von ATP zu Adenosin intra- und extrazellulär: Abbau und Rezeptoren	(12)
Abbildung 4	Schematische Darstellung vom Krankheitserreger bis zur Antikörper-sezernierenden Plasmazelle	(17)
Abbildung 5	Aussähschema für die Durchflusszytometrie Analyse	(26)
Abbildung 6	Gating-Strategie zur Analyse der Adenosinkaskade	(28)
Abbildung 7	Schematische Schmelzkurvenanalyse von zwei Proben A und B	(33)
Abbildung 8	Expression von Adenosinrezeptoren in humanen B-Zellen	(35)
Abbildung 9	Expression von Enzymen der Adenosinkaskade in humanen B-Zellen	(36)
Abbildung 10	Expression von CD73 aus der Adenosinkaskade in humanen B-Zellen	(37)
Abbildung 11	Vergleich der Verteilung verschiedener B-Zell-Untergruppen in SLE Patienten und in gesunden Kontrollen (HC)	(39)
Abbildung 12	Vergleich verschiedener B-Zellsubpopulationen in SLE Patienten und in gesunden Kontrollen (HC) hinsichtlich des Oberflächenmarkers CD73	(40)

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Wichtige Bestandteile unseres Immunsystems kurz zusammengefasst	(16)
Tabelle 2	Eigenschaften der selbst erstellten Primer für Homo sapiens	(31)

10 Danksagung

Ohne die Unterstützung der folgenden Personen wäre mir das Schreiben der Dissertation in dieser Form nicht möglich gewesen. Dafür möchte ich mich an dieser Stelle persönlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Georg Pongratz für die Möglichkeit der Mitarbeit und Ausarbeitung des Projektes in seiner Laborgruppe. Ohne seine kritischen wie hilfreichen Anregungen und Ideen während des gesamten Betreuungszeitraums wäre es nicht zu dieser Ausführung der Dissertation gekommen. Ich bedanke mich außerdem bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Schrader und seinem Team der molekularen Kardiologie für die zusätzliche Betreuung und Kooperation bezüglich weiterführender Versuche. Mit dieser Kooperation war sogar die Publikation des oben genannten Papers möglich. Für den Aufbau der gesamten Studie sowie die Einführung in die Welt des Lupus erythematodes danke ich Frau Dr. Magdalena Siekierka-Harreis. Bei der anfänglich neuen Tätigkeit im Labor stand sie mir mit hilfreichen Ratschlägen, Tipps und lieben Worten beiseite. Außerdem gilt mein Dank dem gesamten Team des Hiller Forschungszentrums, die sowohl in den Pausen für neue Motivation sorgen konnten, als auch nach fehlgeschlagenen Versuchen stets ein offenes Ohr für allerlei Sorgen hatten. Besonders hervorheben möchte ich Frau Dr. Nadine Honke und Herrn Dennis Bleck, die mich durch die Experimente mit Ruhe und Zuversicht hindurch geleitet haben. Die intensive und zuverlässige Zusammenarbeit mit Ihnen hat mir eine praxisnahe Forschung ermöglicht und wertvolle Einblicke über meine Dissertation hinaus gewährt. Danken möchte ich auch den Patientinnen und Patienten meiner Studie, die durch ihre Bereitschaft Blut zu spenden die experimentelle Forschung erst möglich gemacht haben.

Meinem Freund Damian danke ich für seine stetigen Ermutigungen und Zusprüche während des Schreibprozesses der Dissertation. Für eine wunderbare, unvergessliche Studien- und Promotionszeit bedanke ich mich bei meinen Freundinnen Anna, Anke, Debbie, Leonie, Linda und Verena.

Mein letzter Dank gilt insbesondere meiner Familie. Meiner Schwester Frauke für die tatkräftige Unterstützung bei graphischen und rechnerischen Darstellungen sowie bei technischen Schwierigkeiten. Sie konnte mich immer über mein fehlendes Knowhow in diesem Bereich zum Lachen bringen. Meinen Eltern für ihre unermüdliche mentale Unterstützung und Motivation über meine eigenen Grenzen hinaus. Ohne sie wäre dies nicht möglich gewesen.