

Aus der Klinik für Rheumatologie und
dem Hiller Forschungszentrum für Rheumatologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Jörg Distler

**Verteilung und immunsuppressive Wirkung
regulatorischer B-Zellen beim systemischen
Lupus Erythematoses unter Betrachtung
relevanter Zytokine und des Adenosin
A3-Rezeptors**

Dissertation

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

Vorgelegt von
Marie-Laure Schnieringer

2024

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Georg Pongratz

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Germing

Per la mia famiglia.

Pour ma famille.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Hesse J, Siekierka-Harreis M, Steckel B, Alter C, Schallehn M, Honke N, Schnieringer M et al. Profound inhibition of CD73-dependent formation of anti-inflammatory adenosine in B cells of SLE patients. *EBioMedicine* 2021; 73:103616

I. Zusammenfassung (Deutsch)

Beim systemischen Lupus Erythematoses (SLE) handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung, bei der unter anderem eine erniedrigte Aktivität von regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) und regulatorischen B-Zellen (B_{reg}) sowie eine verminderte Fähigkeit zum Abbau von Immunkomplexen eine wichtige Rolle spielen (1). B-Zellen werden im Rahmen von Autoimmunerkrankungen insgesamt als pathogenetisch gewertet, es gibt jedoch zunehmende Evidenz für die Relevanz immunsuppressiv wirkender B_{reg} . Es wurden unterschiedlichste Funktionen von B_{reg} , wie die Produktion von IL-10, TGF- β , IL-35 und Adenosin oder die Stimulation von T_{reg} , aber auch verschiedenste Oberflächenmarker in zahlreichen Studien definiert. Dennoch gibt es weiterhin keine einheitliche Definition zur Charakterisierung von B_{reg} . Eine immunregulatorische Wirkung von A3-Adenosinrezeptor-Agonisten (A3R-Agonisten) wurde für zahlreiche Autoimmunerkrankungen beschrieben. Die Wirkung des A3R an B-Zellen von SLE-Patienten ist allerdings noch unerforscht. Zum genaueren Verständnis der Verteilung von B_{reg} und der Funktion von B-Zellen beim SLE wurden in dieser Arbeit verschiedene B_{reg} -Populationen, Zytokine und Zytokinrezeptoren sowie der A3R in seiner Expression und Funktion auf B-Zellen analysiert. Hierfür wurden B-Zellen von gesunden Probanden und SLE-Patienten mittels Durchflusszytometrie auf charakteristische Oberflächenmarker (CD19, Anti-IgM, CD24, CD5, CD1d und CD11c) untersucht, die mRNA-Expression von IL-10, IL-35, IL-21R, TNFR1, TGF- β 1 und des A3R analysiert, sowie in Zellkulturen die Wirkung von A3R-Agonisten und -Antagonisten auf das Verhalten von B-Zellen hinsichtlich ihrer suppressiven Wirkung auf T-Zellen untersucht.

Wir schlugen hier eine neue CD19+IgM+CD24+CD23-CD1d+CD5+ B_{reg} -Population vor und konnten zeigen, dass B_{reg} bei SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden in ihrer Anzahl vermindert sind und sie zum Großteil den Oberflächenmarker CD11c exprimieren. Zudem konnten wir eine erniedrigte mRNA-Expression von IL-35 in B-Zellen von SLE-Patienten feststellen, während sich bei TGF- β 1, IL-10 und IL-21R keine Unterschiede zu Gesunden beobachten ließen. Die mRNA-Expression von TNFR1 und A3R zeigte sich hingegen bei SLE-Patienten deutlich erhöht. Trotz erhöhter A3R-Expression, konnten wir jedoch bei SLE-Patienten keine statistisch signifikanten Effekte von A3R-Agonisten und -Antagonisten beobachten. Abschließend lässt sich feststellen, dass sowohl numerische als auch funktionelle Defekte in regulatorischen B-Zellen von SLE-Patienten für die Pathophysiologie der Erkrankung relevant zu sein scheinen, während die Rolle der vermehrten A3R-Expression auf B-Zellen von SLE-Patienten weiteren Forschungsbedarf aufweist.

II. Zusammenfassung (Englisch)

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease in which, among other things, a reduced activity of regulatory T cells (T_{reg}) and regulatory B cells (B_{reg}) and a reduced capacity to break down immune complexes play an important role (1). B cells are generally viewed as pathogenetic in the context of autoimmune diseases, but there is increasing evidence for the relevance of immunosuppressive B_{reg} . Different functions of B_{reg} , like the production of IL-10, TGF- β , IL-35 and adenosine or the stimulation of T_{reg} , but also various surface markers have been defined in numerous studies. Nevertheless, there is still no uniform definition to characterize B_{reg} . An immunoregulatory function of A3 adenosine receptor (A3R) agonists has been described for numerous autoimmune diseases. However, the effect of A3R on B cells of SLE patients remains unexplored. To better understand the distribution of B_{reg} and function of B cells in SLE we analyzed different B_{reg} populations, cytokines and cytokine receptors and the expression and function of A3R on B cells. For this purpose B cells from healthy controls and SLE patients were investigated by analyzing characteristic surface markers (CD19, Anti-IgM, CD24, CD5, CD1d and CD11c) in flow cytometry and by measuring mRNA-expression of IL-10, IL-35, IL-21R, TNFR1, TGF- β 1 and the A3R. Furthermore, the effect of A3R agonists and antagonists on the behavior of B cells regarding their suppressive effects on T cells was examined.

We proposed a new CD19+IgM+CD24+CD23-CD1d+CD5+ B_{reg} population and could show that B_{reg} in SLE patients were reduced in their numbers as compared to healthy controls and most of them expressed CD11c on their surface. Moreover, we observed a reduced expression of IL-35 mRNA in B cells from SLE patients, while there were no differences in the mRNA expression of TGF- β 1, IL-10 and IL-21R compared to healthy controls. On the other hand, the mRNA expression of TNFR1 and A3R was elevated in SLE patients. Despite a higher A3R expression, we could not observe any statistic significant effects of A3R agonists and antagonists.

In conclusion, numeric but also functional defects in regulatory B cells on SLE patients seem to be relevant for the pathophysiology of the disease. The relevance of an elevated expression of A3R on B cells from SLE patients remains unclear and requires further research.

III. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	CSIF	<i>cytokine synthesis inhibitory factor</i>
µg	Mikrogramm		
µl	Mikroliter	Ct	<i>cycle threshold</i>
µm	Mikrometer	DC	Dendritische Zelle
µM	Mikromolar	DNA	Desoxyribonucleinsäure
A1R	Adenosin A1 Rezeptor	DPBS	<i>Dulbecco's Balanced Salt Solution</i>
A2AR	Adenosin A2A Rezeptor		
A2BR	Adenosin A2 Rezeptor	dsDNA	doppelsträngige DNA
A3R	Adenosin A3 Rezeptor	Ebi3	<i>Epstein-Barr Virus Induced 3</i>
Abb.	Abbildung	ECLAM	<i>European-Consensus-Lupus-Activity-Measure</i>
ADA	Adenosindesaminase		
AK	Adenosinkinase	E-NTPDase1	Ekto-Nukleosidtriphosphat-Diphosphohydrolase 1
AMP	Adenosinmonophosphat		
ATP	Adenosintriphosphat	Eppi	Eppendorf Reaktionsgefäß
B2M	β2-Mikroglobulin		
BAFF	<i>B cell activating factor</i>	ERK1/2	<i>extracellular regulated kinases 1/2</i>
BCR	<i>b cell receptor</i>		
B _{reg}	regulatorische B-Zellen	FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
bzw.	beziehungsweise		
Ca ²⁺	Calcium	FADD	Fas-assoziiertes DD-Protein
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	FBS	Fetales Kälberserum
CD	<i>cluster of differentiation</i>	FcR	Fc-Rezeptor
cDNA	komplementäre DNA	FoxP3	<i>Forkhead-Box-Protein P3</i>
COPD	Chronisch obstruktive Lungenkerkrankung	FSC	<i>forward scatter</i>
		g	g-Kraft

G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
gDNA	genomische DNA	PKA	Proteinkinase A
HC	<i>Healthy control</i>	PKB	Proteinkinase B
IFN α	Interferon alpha	PKC	Proteinkinase C
IFN γ	Interferon gamma	PLC	Phospholipase C
Ig	Immunglobulin	RNA	Ribonukleinsäure
IL	Interleukin	rpm	<i>revolutions per minute</i>
IL-21R	IL-21-Rezeptor	RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
KI	Konfidenzintervall		
MACS	<i>magnetic cell sorting</i>	s	Sekunden
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>	SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>	SLEDAI	<i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>	SSC	<i>sideward scatter</i>
min	Minuten	t0	Zeitpunkt null
ml	Milliliter	t72	Zeitpunkt 72 Stunden
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>	T _{FH} -Zellen	follikuläre T-Helferzellen
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated b cells</i>	TGF- β	<i>tumor growth factor beta</i>
		T _H -Zellen	T-Helferzellen
		TLR	<i>toll-like receptor</i>
ng	Nanogramm	TNF	Tumornekrosefaktor
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen	TNFR	TNF α -Rezeptor
nM	Nanomolar	T _{reg}	regulatorische T-Zellen
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>	x	Mal

Inhaltsverzeichnis

I.	Zusammenfassung (Deutsch)	V
II.	Zusammenfassung (Englisch).....	VI
III.	Abkürzungsverzeichnis	VII
1	Einleitung	1
1.1	Der systemische Lupus Erythematoses	1
1.2	Ein Überblick über das menschliche Immunsystem.....	2
1.2.1	Lymphozyten allgemein.....	3
1.2.2	T-Zellen und ihre Subpopulationen	3
1.2.3	Allgemeine Rolle und Entwicklung von B-Zellen.....	5
1.2.4	Regulatorische B-Zellen	6
1.2.5	Der Oberflächenmarker CD11c	10
1.2.6	Wichtige Zytokine des Immunsystems	11
1.2.6.1	IL-10	11
1.2.6.2	TGF- β	12
1.2.6.3	IL-35	13
1.2.6.4	IL-21 und der IL-21-Rezeptor	14
1.2.6.5	TNF α und die TNF α -Rezeptoren.....	14
1.3	Die Rolle von Adenosin	15
1.3.1	Der A3-Adenosinrezeptor.....	17
1.4	Ziele dieser Arbeit	19
2	Materialien und Methoden	19
2.1	Materialien	19
2.2	Blutprobengewinnung	28
2.3	PBMC-Separation	29
2.4	B-Zell-Analyse.....	30
2.4.1	Isolierung der Pan-B-Zellen mittels MACS (<i>magnetic cell sorting</i>).....	30

2.4.2	Durchflusszytometrie (FACS).....	32
2.4.2.1	Prinzip.....	32
2.4.2.2	Durchführung.....	32
2.4.2.3	Durchflusszytometrische Gating-Strategie und Auswertung.....	33
2.4.3	Genexpressionsanalyse.....	34
2.4.3.1	RNA-Isolation.....	34
2.4.3.2	cDNA-Synthese.....	36
2.4.4	Farbstoffbasierte quantitative real time PCR.....	37
2.4.4.1	Prinzip.....	37
2.4.4.2	Durchführung.....	37
2.4.4.3	Auswertung.....	38
2.5	Suppressionsassays.....	40
2.5.1	Prinzip.....	40
2.5.2	B-Zell Isolierung.....	40
2.5.3	Stimulation der B-Zellen.....	41
2.5.4	T-Zell Markierung und erste Messung.....	41
2.5.5	Befüllung der Inkubationsplatten, T-Zell Aktivierung und abschließende Messung.....	43
2.5.6	Etablierung und Auswertung.....	44
2.6	Ethik.....	47
3	Resultate.....	47
3.1	Resultate der B-Zell-Analyse.....	47
3.1.1	Regulatorische B-Zellen bei SLE-Patienten vermindert.....	47
3.1.2	Resultate der Genexpressionsanalyse an B-Zellen.....	50
3.1.2.1	Ergebnisse der mRNA-Expression von Zytokinen und Zytokinrezeptoren.....	50
3.1.2.2	Ergebnisse der mRNA-Expression des A3R.....	52
3.2	Resultate Suppressionsassays.....	52
4	Diskussion.....	61

4.1	Der Anteil regulatorischer B-Zellen ist bei systemischem Lupus Erythematodes vermindert.....	61
4.1.1	CD11c lässt sich auf regulatorischen B-Zellen nachgewiesen und ist bei SLE-Patienten vermehrt.....	63
4.2	Keine Unterschiede in der mRNA-Expression von IL-10, TGF- β und dem IL-21R in B-Zellen von SLE-Patienten und Gesunden	64
4.3	Die mRNA-Expression von IL-35 zeigt sich in B-Zellen von SLE-Patienten vermindert.....	68
4.4	Erhöhte mRNA-Expression des TNFR1 auf B-Zellen von SLE-Patienten.....	69
4.5	Die Expression des A3-Rezeptors zeigt sich auf B-Zellen von SLE-Patienten erhöht	71
4.6	Effekte von B-Zellen auf T-Zellen bei SLE-Patienten möglicherweise vermindert.....	72
4.7	Entgegengesetzte Wirkungen von A3R-Agonisten und -Antagonisten auf B-Zellen im Vergleich zwischen Gesunden und SLE-Patienten.....	74
4.8	Schlussfolgerung und Ausblick.....	76
5	Literaturverzeichnis	78
6	Anhang.....	100
6.1	Abbildungsverzeichnis.....	100
6.2	Tabellenverzeichnis	101
7	Danksagung.....	

1 Einleitung

1.1 Der systemische Lupus Erythematoses

Beim systemischen Lupus Erythematoses (SLE) handelt es sich um eine multisystemische chronische Autoimmunerkrankung mit komplexer Pathogenese, bei der verschiedenste Organsysteme, Gewebe und Zellen durch Gewebe-bindende Autoantikörper und Immunkomplexe geschädigt werden (1). Eine entscheidende Rolle spielen hierbei unter anderem eine erniedrigte Schwelle für die Aktivierung von reifen T- und B-Lymphozyten, eine erniedrigte Aktivität der regulatorischen T-Zellen (T_{reg}), regulatorischen B-Zellen (B_{reg}) und Suppressorzellen aus dem Knochenmark, sowie eine verminderte Fähigkeit zum Abbau von Immunkomplexen (1). Insbesondere autoreaktive B-Zellen mit der Entwicklung von Autoantikörpern und Ablagerung von Immunkomplexen in Organen, wie beispielsweise Nieren, Lunge oder Blutgefäßen, und deren anschließende unzureichende Beseitigung, sowie die Aktivierung des Komplementsystems mit folgender inflammatorischer Zytokinausschüttung, sind grundlegende Mechanismen in der Pathophysiologie der Erkrankung, durch die es zu lebensbedrohlichen Organschäden kommen kann (2–5). Zudem geht man davon aus, dass beim SLE autoreaktive B-Zellen durch einen BAFF (*B cell activating factor*)-Überschuss, welcher unter anderem durch vermehrte IFN α (Interferon alpha)-Konzentrationen gefördert wird, besser überleben können, was zusätzlich zur vermehrten Antikörperproduktion führt (6). Die entstehenden Autoantikörper richten sich gegen intrazelluläre Antigene von ubiquitär vorkommenden Zellen, die aus absterbendem Gewebe freigesetzt werden und so zur Bildung der Immunkomplexe beitragen (6). Die Ursachen sind zwar noch nicht abschließend geklärt, es spielen jedoch verschiedene Mechanismen, wie genetische Faktoren, Umweltfaktoren, ethnische und hormonelle Faktoren, aber auch Virusinfektionen, wie beispielsweise die Epstein-Barr-Virus-Infektion eine Rolle (5, 7). Der SLE zeigt hohe geschlechtsspezifische Unterschiede, wobei zu 90 % Frauen betroffen sind (1, 5). Zudem zeigen sich weltweit große Schwankungen in der Prävalenz. Sie beträgt in Mitteleuropa etwa 12,5 von 100 000 Frauen (1). SLE zeigt sehr unterschiedliche Verläufe, stellt sich auch klinisch heterogen dar und ist daher eine Herausforderung für die behandelnden Ärzte sowohl in der Diagnosestellung als auch in der Behandlung der Erkrankung (7, 8). Symptome beim systemischen Lupus Erythematoses können von Anämien und Blutbildveränderungen sowie Haut-Manifestationen oder Psychosen bis zur Arthritis, Glomerulonephritis, Vaskulitis oder zum Apoplex reichen (9). Eine besonders gefürchtete Komplikation ist die Immunkomplexnephritis, welche früher bei sehr schweren Verläufen tödlich war, heutzutage jedoch in den meisten Fällen kontrolliert werden kann (7). Zum Monitoring werden standardisierte SLE-Scores verwendet, wie

der sogenannte *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* (SLEDAI) oder der *European-Consensus-Lupus-Activity-Measure* (ECLAM)-Score (7). Therapeutisch können Glukokortikoide, Antimalariamittel, Azathioprin, in bestimmten Situationen auch Cyclosporin A und Cyclophosphamid, sowie der humane Antikörper Belimumab verwendet werden (7). Auch Mycophenolatmofetil, Mycophenolsäure und Methotrexat werden im *Off-Label-Use* je nach Symptomatik angewandt (7). Trotz der aufgeführten Therapieoptionen, gibt es hier weiterhin Verbesserungsbedarf und eine Heilung des SLE ist bis heute nicht möglich. Zur Entwicklung weiterer Therapieoptionen und zum vollständigen Verständnis der zugrundeliegenden Pathomechanismen gibt es weiteren Forschungsbedarf.

1.2 Ein Überblick über das menschliche Immunsystem

Das Immunsystem ist sehr komplex und besteht aus verschiedensten Zellen und Molekülen, die den Körper vor Krankheitserregern schützen (6, 10). Hierzu gehören äußere Schutzmechanismen, wie die Haut und Schleimhäute der Atemwege, des Darms oder des Urogenitaltraktes, die eine effektive Schutzbarriere bilden, sowie verschiedenste Zellen und lösliche Komponenten als innere Abwehrmechanismen (6, 10). Allgemein unterschieden wird zwischen angeborener und adaptiver Immunität (6). Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems gehören neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten, Mastzellen, Monozyten und Makrophagen sowie dendritische Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) (6, 10). Zur angeborenen Immunantwort gehörige lösliche Faktoren umfassen das Komplementsystem, Zytokine, Akute-Phase-Proteine, Defensine und Lysozym (6, 10). Die adaptive Immunantwort besteht aus T- und B-Zellen sowie aus den durch Plasmazellen ausgeschütteten Antikörpern (6). Der Großteil der Zellen des Immunsystems entwickelt sich aus hämatopoetischen Stammzellen (10). Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen und dendritischen Zellen gehen aus einer gemeinsamen myeloischen Vorläuferzelle hervor, während T- und B-Lymphozyten, sowie natürliche Killerzellen aus der lymphatischen Zellreihe entstehen (6, 10). Während neutrophile Granulozyten zu den Phagozyten gehören und die wichtigste zelluläre Komponente der angeborenen Immunantwort darstellen, können eosinophile und basophile Granulozyten toxische Substanzen freisetzen und spielen vor allem bei dem Schutz vor größeren Krankheitserregern, wie Parasiten, eine Rolle (6). Mastzellen beinhalten Histamin und verschiedene Proteasen und befinden sich auf Schleimhäuten, um die inneren Körperoberflächen zu schützen (6). Dendritische Zellen und Makrophagen sind Phagozyten und antigenpräsentierende Zellen, wodurch sie zur Entstehung von Entzündungsreaktionen beitragen, indem sie verschiedene chemotaktische Zytokine produzieren, die weitere Zellen des Immunsystems, wie neutrophile Granulozyten

und Lymphozyten in Gang setzen, und indem sie über die Präsentation von Antigenpeptiden auf MHC (*major histocompatibility complex*)-Klasse-II-Molekülen zur antigenspezifischen Aktivierung von adaptiven Immunzellen beitragen (6, 10). Das zu den löslichen Komponenten des angeborenen Immunsystems gehörige Komplementsystem besteht aus etwa 30 verschiedenen Plasmaproteinen und hat eine zentrale Funktion, indem es Krankheitserreger direkt angreifen kann, bzw. so markieren kann, dass sie von Phagozyten beseitigt werden (6). NK-Zellen sind wichtig in der frühen angeborenen Immunantwort bei Virusinfekten, während T- und B-Zellen die Träger der adaptiven Immunantwort darstellen (6). Letztere besitzen einen besonderen Reifungsmechanismus, bei dem es über die sogenannte klonale Deletion zur Eliminierung derjenigen Lymphozyten kommt, die sich gegen körpereigene Strukturen richten (6). Kommt es bei diesen Prozessen zu Fehlern und entstehen Zellen, die sich gegen körpereigene Antigene richten, kann Autoimmunität entstehen (6, 10).

Im Folgenden soll nur auf die im Rahmen dieser Arbeit relevanten T- und B-Lymphozyten sowie auf die untersuchten Zytokine genauer eingegangen werden.

1.2.1 Lymphozyten allgemein

Die zwei Gruppen an Lymphozyten unterscheiden sich anhand ihrer Antigenrezeptoren (6). Binden B-Zellen über ihren B-Zell-Rezeptor (BCR) Antigene, differenzieren sie unter dem Einfluss zusätzlicher Co-Stimuli zu antikörperproduzierenden Plasmazellen (6). Bei den T-Lymphozyten unterscheidet man zytotoxische T-Zellen, die infizierte Zellen direkt abtöten können, T-Helferzellen (T_H-Zellen), die andere Zellen wie B-Zellen oder Makrophagen aktivieren und regulatorische T-Zellen, welche die Immunantwort zügeln (6). T- und B-Zellen können nach Bindung an ein Antigen auch zu sogenannten Gedächtniszellen werden, und sorgen dafür, dass die Immunantwort bei erneutem Kontakt mit demselben Antigen schneller und stärker verlaufen kann (6). Nach Aktivierung durch Antigene werden Lymphozyten zu Lymphoblasten, die sich dann letztendlich zu den jeweiligen Effektorzellen weiterentwickeln (6).

1.2.2 T-Zellen und ihre Subpopulationen

T-Lymphozyten wandern zunächst in den Thymus und reifen dort heran, indem sie erlernen an ihre jeweiligen MHC-Moleküle zu binden und körpereigene Antigene von körperfremden zu unterscheiden (6, 10). CD4⁺ T-Zellen erkennen nur die durch antigenpräsentierende Zellen über MHC-Klasse-II-Moleküle angebotenen Peptidfragmente, während CD8⁺ T-Zellen solche erkennen, die über MHC-Klasse-I-Moleküle, die ubiquitär auf kernhaltigen Körperzellen zu finden sind, präsentiert werden (6, 10). Die naiven T-Zellen, also solche, die noch keinen Kontakt zu Antigenen hatten, werden durch

Chemokine in die T-Zell Zonen sekundärer lymphatischer Gewebe gelockt, wo sie dann vorübergehend an antigenpräsentierende Zellen binden, um über entsprechende Signale aktiviert zu werden (6). Hierbei bindet der T-Zell-Rezeptor mit dem jeweiligen Co-Rezeptor (CD4 oder CD8) an das jeweilige MHC-Molekül mit dem präsentierten Peptid (6). Für die Stimulierung der T-Zelle zur Proliferation und Differenzierung sind jedoch weitere Signale, wie beispielsweise die Bindung von sogenannten B7-Molekülen von der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen an das CD28, den zugehörigen Rezeptor auf der T-Zell-Oberfläche, notwendig (6). Eine weitere wichtige co-stimulierende Verbindung ist die zwischen dem auf antigenpräsentierenden Zellen, wie beispielsweise B-Zellen, exprimierten Rezeptor CD40 und dem CD40-Liganden auf T-Zellen, die dazu führt, dass die antigenpräsentierende Zelle dazu angeregt wird mehr B7-Moleküle zu exprimieren (6). Nach ihrer Aktivierung produzieren naive T-Zellen Interleukin 2 (IL-2), ein Zytokin, welches sowohl für T_{reg} , als auch für die weitere Differenzierung der aktivierten naiven T-Zellen essentiell ist, und exprimieren weitere Proteine zur zusätzlichen Zelldifferenzierung auf ihrer Oberfläche. Hierzu gehört z. B. ICOS (*inducible costimulator*), der besonders für die Interaktion zwischen CD4+ T-Zellen und B-Zellen wichtig ist (6). Während CD8+ T-Effektorzellen ihre Zielzellen direkt abtöten, indem sie zytotoxische Granula mit Granzymen, Granzysin und Perforin freisetzen, differenzieren CD4+ T-Zellen über durch Zytokine in Gang gesetzte Signalwege zu den verschiedenen Untergruppen an T_H -Zellen (6).

T_H1 -Zellen produzieren $IFN\gamma$ (Interferon gamma), welches unter anderem autokrin wirkt, und sie können Makrophagen aktivieren, damit auch solche Keime, die innerhalb von Makrophagen überleben, beseitigt werden können (6).

T_H2 -Zellen entwickeln sich nach Stimulation durch IL-4 und sind bei parasitären Infektionen von Bedeutung, da sie Mastzellen und eosinophile Granulozyten unterstützen, sowie B-Zellen zur Produktion von IgE (Immunglobulin E) anregen (6).

Die T_H17 -Zellentwicklung wird durch IL-6 und TGF- β stimuliert. Diese T-Zell-Subpopulation verstärkt unter anderem die Reaktion von neutrophilen Granulozyten, stimuliert B-Zellen zur Produktion von IgG2 und IgG3 und produziert IL-17 und IL-22, wodurch sie vor allem bei Infektionen durch Bakterien und Pilze wichtig ist (6).

T_{FH} -Zellen (follikuläre T-Helferzellen) produzieren unter anderem IL-4, IL-6, $IFN\gamma$, IL-17 und IL-21 und stimulieren B-Zellen zur Antikörperproduktion (6).

T_{reg} wirken hemmend auf die T-Zell-Antwort, indem sie unter anderem IL-10, IL-35 und TGF- β produzieren, und können so die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen verhindern. Man unterscheidet natürliche T_{reg} , die bereits im Thymus entstehen und induzierte T_{reg} , die aus peripheren CD4+ T-Zellen bei Stimulation mit TGF- β und IL-2 entstehen (6). Ist bei Entzündungen jedoch zusätzlich vermehrt IL-6 vorhanden, wird stattdessen die Differenzierung zu T_H17 Zellen stimuliert, sodass die Differenzierung der immunsuppressiven T_{reg} gehemmt wird. Charakteristisch für T_{reg} ist die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3, wobei es auch eine Untergruppe an T_{reg} gibt, die diesen nicht exprimiert (6).

1.2.3 Allgemeine Rolle und Entwicklung von B-Zellen

B-Zellen sind wichtige Bestandteile des Immunsystems und tragen mit verschiedenen Mechanismen, wie Antigenpräsentation, Co-Stimulation, Zytokinproduktion und Antikörperproduktion sowohl zur angeborenen als auch zur adaptiven Antwort des Immunsystems bei (11, 12). Hierbei ist CD19, das während fast der gesamten Entwicklung exprimiert wird, einer der frühesten Marker für B-Zellen (6). Über verschiedene Signale entwickeln sich aus den gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzellen im Knochenmark in mehreren Schritten die B-Zellen (6). Zunächst entwickelt sich eine frühe Pro-B-Zelle zu einer späten Pro-B-Zelle, welche dann zur kleinen Prä-B-Zelle wird, die dann zunächst zur unreifen B-Zelle und schlussendlich zur reifen B-Zelle wird (6). Vor der Entwicklung von der unreifen zur reifen IgM+IgD+ B-Zelle, werden unreife B-Zellen auf Autoreaktivität geprüft, und solche B-Zellen, die sich gegen körpereigene Antigene richten, beseitigt (6). Diese im Knochenmark entwickelte Toleranz gegenüber des eigenen Körpers bezeichnet man als zentrale Toleranz (6). Unreife B-Zellen können auch über sogenanntes Rezeptor-*editing* ummoduliert werden, damit sie nicht vernichtet werden müssen (6). Hierbei kommt es durch Genumlagerung zum Austausch des autoreaktiven Rezeptors. Defekte bei diesem Mechanismus spielen unter anderem beim SLE eine Rolle (6). Nach der letzten Prüfung wandern die unreifen B-Zellen, die man nach Austritt aus dem Knochenmark auch transitionale B-Zellen nennt, in periphere lymphatische Organe, wo die Reifung vollendet wird (6). Hierbei werden gegen periphere Antigene gerichtete autoreaktive B-Zellen vernichtet, was als periphere Toleranz bezeichnet wird (6). In den B-Zell-Follikeln der Milz kommt es durch verschiedene Signale, wie besonders durch die Wirkung von BAFF, zur Ausreifung der B-Zellen (6). Kommt es zu Kontakt mit einem Krankheitserreger, bindet die B-Zelle das Antigen über den B-Zell-Rezeptor, wodurch zum einen eine Signalkaskade ausgelöst wird und zum anderen das Antigen ins Zellinnere transportiert wird, um es in Peptide zu zerlegen, die dann an der Zelloberfläche für die T_H -Zellen präsentiert werden (6). Durch die Zusammenarbeit

zwischen T_H-Zellen und B-Zellen können letztere dann zu antikörperproduzierenden Zellen und B-Gedächtniszellen differenzieren (6). Über die durch T_{FH}-Zellen ausgeschütteten Zytokine, wie IL-21, IL-4, IL-6, TGF- β und IFN γ , wird das Überleben der B-Zellen gefördert und der Typ der später produzierten Antikörper reguliert (6).

Neben dieser klassischen Rolle von B-Zellen zur Produktion von Antikörpern, für die sie im Rahmen von Autoimmunerkrankungen insgesamt als pathogenetisch gewertet werden, gibt es zunehmende Evidenz dafür, dass sie auch immunsuppressiv wirken können (13). Auf diese immunsuppressiv wirkenden B-Zellen soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

1.2.4 Regulatorische B-Zellen

Die Bezeichnung "regulatorische B-Zellen" (B_{reg}) wird allgemein dafür verwendet antiinflammatorisch wirkende B-Zellen zu beschreiben (14). In den letzten Jahrzehnten wurden unterschiedliche B_{reg}-Untergruppen mit verschiedenen Funktionen und Oberflächenmarkern in zahlreichen Studien definiert (15). Dennoch gibt es weiterhin keinen Konsensus über die Klassifikation dieser B-Zell-Population, und eine einheitliche Definition zur Charakterisierung von B_{reg} anhand von Oberflächenmarkern konnte bis heute nicht aufgestellt werden (14, 16–19). Auch wurde bisher kein einheitlicher Transkriptionsfaktor, wie es ihn z. B. für regulatorische T-Zellen mit dem FoxP3 gibt, für regulatorische B-Zellen entdeckt (15), was möglicherweise daran liegen könnte, dass multiple B_{reg}-Subpopulationen existieren (20) oder daran, dass es sich um B-Zellen handelt, die nur unter bestimmten Einflüssen ihre immunregulatorischen Eigenschaften entfalten können (11). Die Signalwege, über die B-Zellen zu B_{reg} differenzieren, bzw. über die sie zu einer immunsuppressiv wirkenden Zellpopulation werden können, sind ebenfalls weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung.

Ein wichtiger Mechanismus, über den B_{reg} ihre immunmodulatorischen Eigenschaften ausüben, wurde zunächst im Mausmodell und später auch beim Menschen identifiziert und besteht in der Ausschüttung von IL-10 (13, 17–28). Solche IL-10-produzierenden B_{reg} werden B10 genannt (22, 25). Auf die verschiedenen Funktionen von IL-10 wird unter Punkt 1.2.6.1 genauer eingegangen. Bereits 2002 zeigte sich die Relevanz von B10 bei Mäusen mit experimenteller Autoimmunenzephalitis. Hier wurden nach Stimulation mit CD40-Agonisten bei Mäusen in Remission IL-10-produzierende B-Zellen identifiziert (28). Mäuse ohne B-Zellen oder mit CD40-Defizienz erholten sich in diesem Versuch nicht von der experimentellen Autoimmunenzephalitis, sodass hier postuliert wurde, dass von B10 ausgeschüttetes IL-10 für eine Remission notwendig ist. Zudem entwickelte sich hier nach Transfer von IL-10-produzierenden B-Zellen in Mäusen mit

Autoimmunenzephalitis eine mildere Form der Erkrankung, sodass ein immunsuppressiver Effekt festgestellt werden konnte (28). Eine weitere Arbeitsgruppe konnte *in vivo* im Mausmodell sowie *in vitro* zeigen, dass über eine antigen-vermittelte Antwort über CD40 stimulierte B-Zellen IL-10 produziert wird und entzündungshemmend bei rheumatoider Arthritis wirkt (27). Eine Co-Stimulation über T-Zellen scheint erforderlich zu sein, da für den immunsuppressiven Effekt in dieser Studie zusätzlich das Vorhandensein von T-Zellen notwendig war (27). Die Arbeitsgruppe Yanaba, Bouaziz et al. identifizierte 2008 im Mausmodell eine IL-10-produzierende CD19+CD5+CD1d+ B-Zell Population aus der Milz. Die meisten dieser IL-10-produzierenden B_{reg} exprimierten zudem vermehrt IgM, CD1d und CD24 auf ihrer Zelloberfläche, jedoch kein CD23 (20, 29). Zudem konnte an Mäusen gezeigt werden, dass T-Zell-vermittelte Entzündungsreaktionen durch IL-10 aus B_{reg} gehemmt werden (20). Eine Blockade des IL-10-Rezeptors durch entsprechende Antikörper zeigte hier eine verstärkte Kontakthypersensibilität im Vergleich zur Kontrollgruppe (20). Darüber hinaus hatte in dieser Studie die Hinzugabe von CD1d+CD5+ B-Zellen zu CD19-defizienten Mäusen eine immunregulatorische Wirkung (20). Da CD1d+CD5+ B-Zellen nur zu einem sehr geringen Anteil im peripheren Blut vorkommen, untersuchte dieselbe Arbeitsgruppe, ob CD1d+CD5- B-Zellen zur IL-10-Produktion angeregt werden können. Über eine Stimulation mit CD40-Agonisten über 48 Stunden konnte die IL-10-Produktion dieser Zellen *in vitro* am Mausmodell um das 6- bis 9-fache gesteigert und die Expression von CD5 auf der Zelloberfläche induziert werden (26). Zudem konnte hier eine T-Zell unabhängige Aktivierung der IL-10 Ausschüttung durch B10-Zellen gezeigt werden (26). Auch beim Menschen wurden Studien durchgeführt, in denen die Kapazität von B-Zellen IL-10 auszuschütten untersucht wurde. Bei immuntoleranten Nierentransplantierten wurden vermehrt CD19+CD38+CD24+IgD+ B-Zellen festgestellt, sowie eine vermehrte IL-10-Produktion im Vergleich zu solchen Patienten, die nach Nierentransplantation eine immunsuppressive Therapie benötigten (30). In einer Studie von Blair et al. aus dem Jahr 2010 konnten CD19+CD24+CD38+ B-Zellen als Untergruppe mit vermehrter IL-10-Produktion nach Stimulation mit CD40 identifiziert werden (21). Zudem konnte in Co-Kulturen mit CD4+ T-Zellen ein suppressiver Effekt mit Hemmung der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie TNF α und IFN γ durch diese T-Zellen verzeichnet werden (21). In einer anderen Studie konnten CD9, CD38 und CD39 als wichtige Oberflächenmarker nach Stimulation auf IL-10-produzierenden B-Zellen beobachtet werden (17). Eine weitere Arbeitsgruppe identifizierte wiederum CD24+CD27+ B_{reg} als IL-10-produzierend, worüber diese dazu in der Lage waren die TNF α Ausschüttung durch Monozyten zu hemmen (24). Eine genauere Untersuchung der Oberflächenmarker zeigte eine ver-

stärkte Expression von CD19, CD24, CD27, IgM und CD25, wobei sich nach Stimulation ebenfalls eine erhöhte Dichte von CD1d, CD20, CD21, CD23 und CD38 ergab (24). Die stärkste B10 Zell-Differenzierung konnte in dieser Studie mit dualer Stimulation über CD40 und TLR9 Stimulation erreicht werden (24). Von einer weiteren Arbeitsgruppe wurde eine CD19+CD5+CD1d+ B_{reg} Subpopulation aus dem peripheren Blut bei gesunden Menschen isoliert. Hier zeigte sich ein Mittelwert für gesunde Menschen bei 33,34 % der Gesamt-B-Zellen. Diese Zellpopulation wurde hier als IL-10- und TGF- β -produzierend identifiziert (31).

Ein weiterer beschriebener Mechanismus ist die Stimulation mit IL-21, welche bei humanen B-Zellen dazu führen kann, dass die proapoptotische Serinprotease Granzym B, die auch durch T_{reg} zur Regulierung von Immunantworten verwendet wird, ausgeschüttet wird (32, 33). Eine Studie aus dem Jahr 2013 zeigt, dass über diesen Mechanismus mit zusätzlicher Stimulierung über TLR9 beim Menschen B_{reg} induziert werden, die so CD4+ T-Zellen hemmen können (34). Die hier untersuchte B_{reg}-Zellpopulation zeigte unter anderem eine Hochregulation von CD1d, IgM und CD86 (34). Auch eine weitere Studie aus dem Jahr 2012 zeigt eine Beteiligung von IL-21 an der B_{reg}-Differenzierung, wobei hier eine Entstehung von IL-10-produzierenden B_{reg} festgestellt wurde (35). Dies suggeriert, dass IL-21 ebenfalls ein wichtiges Zytokin für die Entstehung regulatorischer B-Zellen darstellt.

Die Arbeitsgruppe um Chien-Hui et al. fand 2017, dass regulatorische B-Zellen auch ohne IL-10 über direkten Zellkontakt zur Differenzierung einer T_{reg}-Population führen können (36).

Auch IL-35 spielt eine wichtige Rolle für die Funktion von B_{reg}. Die Arbeitsgruppe um Wang et al. konnte 2014 zeigen, dass IL-35 im Mausmodell zu einer Hemmung von B- und T-Zellen sowie zu einer deutlichen Zunahme der IL-35-produzierenden B-Zell-Population (von 7,8 % auf 35,3 %) führt (37). 17,8 % dieser Zellen waren zusätzlich dazu in der Lage IL-10 zu produzieren (37). Eine andere Arbeitsgruppe konnte ebenfalls zeigen, dass IL-35-produzierende B-Zellen wichtige Regulatoren des Immunsystems sind (38). Durch Stimulation mit TLR4 und CD40 im Mausmodell sezernierten B-Zellen IL-35 und wirkten hemmend bei experimenteller Autoimmunenzephalitis (38). Die höchste mRNA-Konzentration für IL-10 und Ebi3 (eine Untereinheit von IL-35) konnte in dieser Studie bei CD138+ B-Zellen festgestellt werden (38).

Eine andere B_{reg}-Population wurde von der Arbeitsgruppe Figueiró et al. über die vermehrte Expression von CD39 und CD73 definiert (39). Diese *in vitro* aktivierten B_{reg} wiesen eine hohe Ausschüttung bzw. Bildung von 5'-AMP (Adenosinmonophosphat) und Adenosin sowie von IL-10 auf und konnten in Co-Kulturen die T-Zell Proliferation hemmen (39). Eine weitere Studie zeigte, dass B-Zellen, die für mehrere Tage über CD40 und IL-4 stimuliert wurden, CD39 hochregulierten und die Produktion von 5'-AMP, Adenosin und Inosin erhöhten, wodurch sie auf T-Zellen supprimierend wirkten (40). Die untersuchten B-Zellen konnten hier in Anwesenheit von ATP (Adenosintriphosphat) sogar mehr Adenosin produzieren, als T_{reg} (40). Die Rolle der Adenosinentstehung für die immunsuppressive Funktion von T_{reg} wurde bereits in anderen Studien festgestellt (41). T_{reg} zeigen beispielsweise eine erhöhte Expression von CD39 und CD73 auf Mäusen, und CD39-negative T_{reg} waren um 50-60 % weniger effektiv in der Hemmung der T-Effektorzellen (41). Die Bedeutung von Adenosin im menschlichen Immunsystem wird unter Punkt 1.3 genauer beschrieben.

Insgesamt werden in der Literatur demnach viele unterschiedliche Wirkmechanismen und Stimulationsmechanismen von B_{reg} erwähnt. Eine zusammenfassende Darstellung der wichtigsten erwähnten Mechanismen findet sich in Abb. 1.

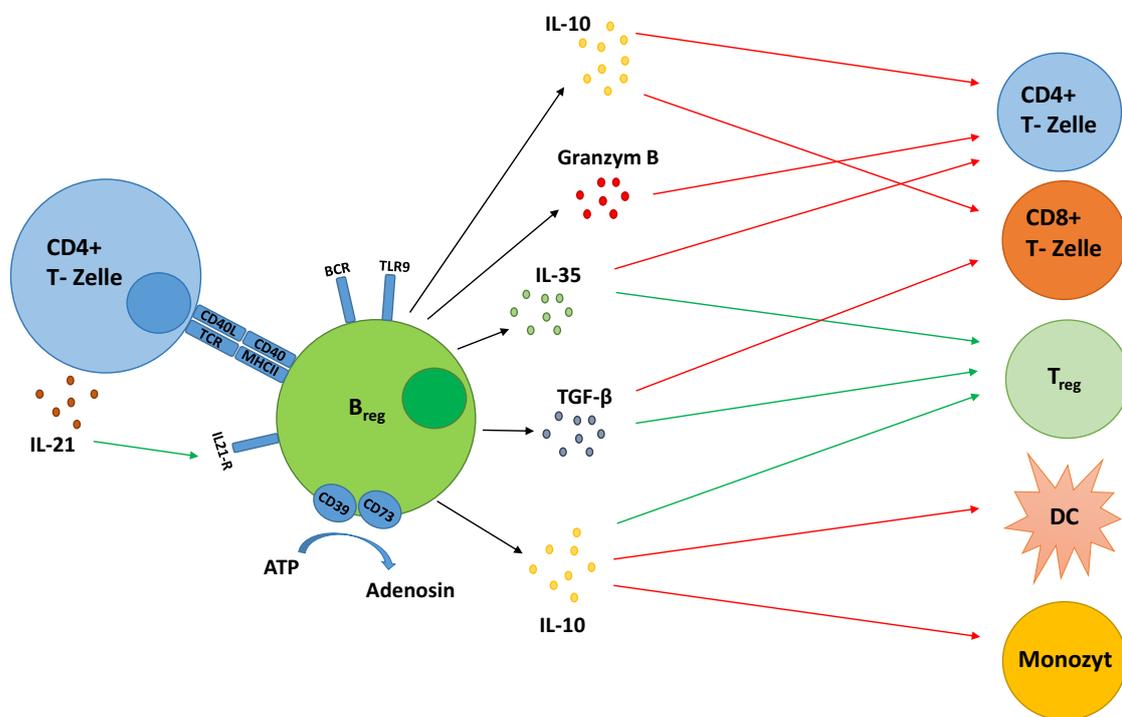


Abb. 1: Schematische Darstellung bisher untersuchter Wirkmechanismen und Stimulationsmechanismen regulatorischer B-Zellen

Grüne Pfeile stellen eine stimulierende Wirkung, während rote Pfeile eine inhibierende Wirkung auf die Zielzelle darstellen. IL = Interleukin, CD = *cluster of differentiation*, DC = Dendritische Zelle, B_{reg} = regulatorische B-Zelle, T_{reg} = regulatorische T-Zelle, IL21-R = IL-21-Rezeptor, BCR = B-Zell-Rezeptor, TCR = T-Zell-Rezeptor, TLR = *Toll-like-receptor*, TGF = *transforming growth factor*, ATP = Adenosintriphosphat, MHC = *major histocompatibility complex*

Es gibt bisher insgesamt nur wenige Studien, die sich mit B_{reg} bei SLE im Menschen auseinandergesetzt haben. In einer Studie der Arbeitsgruppe um Blair et al. zeigte sich der prozentuale Anteil CD19+CD38+CD24+ B_{reg} bei SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht und die immunregulatorische Funktion dieser B_{reg} bei SLE-Patienten tendenziell vermindert (21). Der hier festgestellte erhöhte Anteil regulatorischer B-Zellen bei SLE-Patienten konnte bei gleich definierter Population durch weitere Studien bestätigt werden (42, 43), während durch eine andere Arbeitsgruppe wiederum keine Unterschiede beobachtet werden konnten (44). In einer weiteren Studie, in der CD19+CD5+ und CD19+CD5+CD1d+ B-Zellen als B_{reg} definiert wurden, zeigten sich bei SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden verminderte Zellzahlen (45). Zudem konnte hier nach Therapie ein Anstieg der B_{reg}-Zahlen verzeichnet werden, so dass ein Zusammenhang zwischen SLE und verminderten B_{reg}-Konzentrationen vermutet wurde (45). Zudem konnte eine andere Arbeitsgruppe ebenfalls einen geringeren Anteil IL-35+, IL-10+ und CD5+ B_{reg} innerhalb der CD19+ B-Zellen von SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden feststellen (46). Darüber hinaus zeigte sich die Plasmakonzentration von IL-35 bei SLE-Patienten erniedrigt (46). Hier konnte eine inverse Korrelation zwischen IL-10- und IL-35-Spiegel bzw. Prozentzahl der entsprechenden B_{reg} und der Krankheitsaktivität beobachtet werden, was ebenfalls auf eine pathogenetische Rolle der verminderten B_{reg}-Zellzahl hindeutet (46). Aufgrund geringer Studienzahlen und stark variierender Studiendesigns, wird die Verteilung und Funktion regulatorischer B-Zellen im systemischen Lupus Erythematoses weiterhin erforscht.

1.2.5 Der Oberflächenmarker CD11c

CD11c ist allgemein als Marker für dendritische Zellen bekannt. Zusätzlich wurde seine Expression jedoch auch auf Makrophagen, NK-Zellen, T-Zellen und B-Zellen beschrieben (47). Die Funktion von CD11c *in vivo* wird weiterhin untersucht (47). Im Zusammenhang mit B-Zellen ist der Oberflächenmarker bisher nur in geringem Maße erforscht. CD11c konnte zwar in einer Studie auch auf IL-10-produzierenden B-Zellen identifiziert werden (17), insgesamt deutet die Studienlage jedoch auf eine pathogene Rolle von CD11c+ B Zellen in Autoimmunerkrankungen hin (48–51). So wurden beispielsweise in Studien an Mäusen CD11c+ B-Zellen als antikörperproduzierende Zellen identifiziert (49, 52). In einer weiteren Studie zeigten sich CD11c+ B Zellen zwar

nur in sehr geringen Konzentrationen im peripheren Blut, waren bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen jedoch vermehrt zu finden (48). CD11c+ B-Zellen scheinen in Autoimmunerkrankungen mit erhöhten Antikörper-Titern zu korrelieren bzw. eine erhöhte Fähigkeit zu besitzen zu antikörperproduzierenden Zellen zu differenzieren (50, 51). Zudem konnte in einer Studie an SLE-Patienten ein Zusammenhang mit der Krankheitsaktivität nachgewiesen werden (50). Als möglicherweise im Rahmen von therapeutischen Interventionen interessanter Oberflächenmarker sollte in dieser Arbeit die Expression von CD11c auf B_{reg} ebenfalls genauer untersucht werden.

1.2.6 Wichtige Zytokine des Immunsystems

Zytokine sind kleine Proteine, die dem Zusammenspiel zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem dienen, als Antwort auf einen aktivierenden Reiz von verschiedenen Körperzellen ausgeschüttet werden können und ihre Botschaft über entsprechende Rezeptoren auf der jeweiligen Zielzelle vermitteln. Insgesamt gibt es über 60 verschiedene Zytokine, die anhand ihrer Struktur in verschiedene Familien eingeteilt werden können. Hierzu gehören die Interleukine, Tumornekrosefaktoren, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren sowie Interferone (6, 10). Im Folgenden sind diejenigen Zytokine bzw. Zytokinrezeptoren genauer aufgeführt, die im Zusammenhang mit B_{reg} eine Rolle spielen und in dieser Arbeit untersucht wurden.

1.2.6.1 IL-10

IL-10 ist im Menschen ein homodimeres Zytokin, das über seinen spezifischen Oberflächenrezeptorkomplex, der auf vielen Zellen, insbesondere Immunzellen, exprimiert wird, seine Wirkung entfaltet (53–55). Es wird von den meisten Leukozyten wie beispielsweise Makrophagen, B-Zellen, T-Zellen und dendritischen Zellen produziert, ist vor allem für seine immunregulatorischen Funktionen bekannt, kann jedoch auch proinflammatorische Wirkungen ausüben (6, 27, 53, 56–58). Bereits im Jahre 1989, damals CSIF (*cytokine synthesis inhibitory factor*) genannt, konnte gezeigt werden, dass es von T_H2-Zellen produziert wird, und die Zytokinausschüttung von IFN γ und anderen proinflammatorischen Zytokinen durch T_H1-Zellen hemmt (55, 56, 59). Die biologischen Effekte von IL-10 wurden in den letzten Jahren ausgiebig untersucht, sind aber weiterhin nicht vollständig geklärt. Nach aktuellem Wissensstand sind hauptsächlich Monozyten und Makrophagen Zielzellen der inhibitorischen Effekte von IL-10 (53). So konnte beispielsweise in mehreren Studien gezeigt werden, dass IL-10 die Ausschüttung von TNF α , IL-1 und IL-6 durch Monozyten hemmt (60, 61). Generell ist IL-10 dazu in der Lage die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine durch antigenpräsentierende Zellen sowie deren Expression ihrer MHC-Moleküle zu hemmen (6, 56, 60–62). An

PBMC konnte gezeigt werden, dass IL-10 die Ausschüttung von IL-12 und IFN γ hemmen kann (63). Zudem inhibiert es die Produktion der Zytokine IL-12 und IL-23, welche der Differenzierung von T-Zellen zu T_H1- und T_H17-Zellen dienen, die wiederum Makrophagen aktivieren bzw. B-Zellen zur Antikörperproduktion anregen können (6, 56, 64, 65). Darüber hinaus spielt IL-10 eine Rolle in der Differenzierung von T-Zellen zu T_{reg}, welche im Darm die Hauptquelle des Zytokins darstellen, und kann wiederum durch diese auch produziert werden (6, 66, 67). Jedoch kann IL-10 auch B-Zellen zur Antikörperproduktion stimulieren (62, 68, 69). Es ist im Rahmen von Autoimmunerkrankungen allgemein aufgrund seiner Rolle als immunregulatorisches Zytokin von Bedeutung (27, 56). Am Beispiel der rheumatoiden Arthritis im Mausmodell konnte dem von B-Zellen ausgeschütteten IL-10 beispielsweise eine entzündungshemmende Wirkung zugeschrieben werden (27). Außerdem konnte beobachtet werden, dass IL-10-defiziente Mäuse eine Form der chronischen Enterokolitis mit einer vermehrten Anzahl von IgA- und IgG-produzierenden Plasmazellen entwickeln (70, 71). Beim SLE konnten im Mausmodell ebenfalls immunsuppressive Effekte von IL-10 mit einer verminderten Entstehung von Autoantikörpern und einer verminderten Nierenbeteiligung festgestellt werden (72, 73). Jedoch gibt es zunehmend Hinweise darauf, dass das Zytokin bei SLE auch krankheitsfördernd wirken kann (71, 74, 75). So wurden in einigen Studien an SLE-Patienten erhöhte IL-10 Serumkonzentrationen festgestellt, welche mit der Krankheitsaktivität bzw. mit erhöhten Antikörperspiegeln korrelierten (74, 75).

1.2.6.2 TGF- β

TGF- β ist ein wichtiges immunregulatorisches Zytokin, das bei Säugetieren in den drei verschiedenen Isoformen TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 vorzufinden ist (11, 76–81). Es gehört zu den stärksten proliferationsinhibierenden Zytokinen und reguliert die Genexpression verschiedener Proteine, wobei es seine Wirkung über die Bindung an den tetrameren TGF- β -Rezeptorkomplex entfaltet und je nach Kontext und Vorhandensein anderer Faktoren, wie beispielsweise anderer Zytokine, unterschiedliche Funktionen ausgeübt werden können (79, 81). Neben seiner proliferationsinhibierenden Funktion, kann TGF- β in einigen Situationen die Zellproliferation fördern, was unter anderem an seinen Funktionen in der Wundheilung und in der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen erkennbar ist (14, 79, 82, 83). TGF- β 1 ist im Rahmen von Autoimmunerkrankungen besonders relevant, dient Differenzierung und Regulierung von T-Zellen und scheint sowohl qualitativ als auch quantitativ die wichtigste Isoform des Zytokins zu sein (79–81, 84–86). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass genmanipulierte Mäuse, die kein TGF- β 1 produzieren können, bereits in ihrem ersten Lebensmo-

nat überschießende Immunreaktionen mit Organversagen entwickeln und daran versterben (80). Außerdem konnte gezeigt werden, dass TGF- β die Bildung autoreaktiver B-Zellen sowie die IL-2-abhängige T-Zell-Proliferation hemmen kann (87, 88). Man stellte zudem auch eine immunregulatorische Wirkung an NK-Zellen und dendritischen Zellen fest. TGF- β -resistente NK-Zellen produzieren vermehrt IFN γ , und Knockout-Mäuse, die keinen TGF- β -Rezeptor auf dendritischen Zellen exprimieren können, sterben innerhalb von 15 Wochen aufgrund von Autoimmunreaktionen, die zu multiplen Organschäden führen (81, 89, 90). Bei chronischen Infektionen führt TGF- β durch die Hochregulation proapoptotischer Proteine zur Apoptose von CD8 $^+$ T-Zellen (81, 91). Besonders wichtig ist TGF- β auch für die Entstehung von T_{reg} (6, 66, 81, 88, 92, 93). Naive T-Zellen entwickeln sich unter dem Einfluss von TGF- β und anderen proinflammatorischen Zytokinen zu T_{reg} oder T_H17-Zellen, wobei die Entstehung von T_H1 und T_H2-Zellen gehemmt wird (6, 81, 93). Gibt es keine Pathogene und somit weniger IL-6 wird die Entwicklung zu T_{reg} begünstigt, ansonsten wird gemeinsam mit IL-6 die Entstehung der proinflammatorisch wirkenden T_H17 Zellen induziert (6, 94). TGF- β wird zudem von T_{reg} selbst sezerniert und wirkt somit autokrin (6, 66, 93). Aufgrund der dargelegten insgesamt überwiegend antiinflammatorisch wirkenden Eigenschaften von TGF- β , ist seine Untersuchung im Zusammenhang mit B_{reg} und SLE von Interesse.

1.2.6.3 IL-35

Beim IL-35 handelt es sich um ein heterodimeres Zytokin aus der IL-12-Familie, welches aus einer IL-12a- und einer Ebi3-Untereinheit besteht, hauptsächlich von regulatorischen T-Zellen, aber auch von dendritischen Zellen und regulatorischen B-Zellen gebildet wird und insgesamt eine immunsuppressive Funktion hat (6, 37, 38, 67, 95, 96). Seine immunsuppressive Wirkung konnte in verschiedenen Studien an Maus und Mensch nachgewiesen werden. In einer Studie an diabetischen Mäusen beispielsweise wirkte IL-35 protektiv gegen Autoimmundiabetes (97). Der Transfer von IL-35-produzierenden dendritischen Zellen wirkt immunsuppressiv, hemmt CD4 $^+$ und CD8 $^+$ T-Zellen und kann experimentelle Autoimmunenkephalitis in Mäusen hemmen (96), während eine Hinzugabe von IL-35-defizienten T_{reg} am Colitismodell bei Mäusen, die sich normalerweise nach Hinzugabe von T_{reg} von der Krankheit erholen, kaum Effekte zeigt (95). Eine weitere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass humanes IL-35 insgesamt die Proliferation von CD4 $^+$ T-Zellen hemmt und zur Differenzierung von T-Zellen zu einer IL-35-produzierenden T_{reg} Subpopulation führt (66). Die immunregulatorischen Funktionen von IL-35 im Zusammenhang mit B_{reg} wurden bereits unter Punkt 1.2.4 beschrieben. Interessanterweise ist die Anzahl an IL-12a und Ebi3 Transkripten insgesamt niedrig, wenn die Immunzellen vorher nicht entsprechend stimuliert wurden (98). Über

die Untersuchung der IL-12a und Ebi3 mRNA-Expression konnte jedoch gezeigt werden, dass IL-35 bei Entzündungsreaktionen, z. B. nach Reaktion auf TNF α oder IFN γ , hochreguliert werden kann (99). Aufgrund seiner immunsuppressiven Funktion ist IL-35 im Zusammenhang mit SLE von Bedeutung.

1.2.6.4 IL-21 und der IL-21-Rezeptor

IL-21 gehört zu einer Familie von Zytokinen, die an eine gemeinsame γ -Kette sowie an einen eigenen Rezeptor binden, der sich IL-21R (IL-21 Rezeptor) nennt (100). Seine Hauptfunktion besteht in der Regulierung der T-Zell-abhängigen B-Zell-Aktivierung (101). Es wird von CD4⁺ T-Zellen produziert und dient dazu die Proliferation von B-, T- und NK-Zellen zu induzieren sowie über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 die Differenzierung von B-Zellen und deren Entwicklung zu Plasmazellen und Gedächtniszellen zu fördern, wodurch es auch zur humoralen Immunantwort beiträgt (6, 35, 101–103). Es wurde jedoch auch eine proapoptotische Wirkung von IL-21 an B-Zellen beschrieben (104). Der IL-21R wird beim Menschen nur von lymphatischem Gewebe und Zellen wie Milz, Thymus, Lymphknoten und den Lymphozyten exprimiert (102, 105). In Bezug auf Entwicklung und Fortschreiten von Autoimmunerkrankungen wird IL-21 aufgrund seiner Rolle in der Plasmazelldifferenzierung insgesamt als pathogen gewertet (106, 107), wobei es auch Studien gibt, die zeigen, dass die Stimulation mit IL-21 zur Entwicklung regulatorischer B-Zellen führen kann (34, 35). Letzteres wurde in Abschnitt 1.2.4 bereits beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass die Blockade des IL-21 Signalwegs mit entsprechenden Antikörpern eine therapeutische Rolle spielt und die Symptome von Autoimmunerkrankungen hemmt, sowie die Prognose verbessert (107), sodass eine genauere Untersuchung der Verteilung des IL-21R beim Lupus auch in diesem Zusammenhang von Interesse ist.

1.2.6.5 TNF α und die TNF α -Rezeptoren

TNF α ist ein wichtiges multifunktionelles Zytokin, das überwiegend pro-inflammatorisch, aber auch anti-inflammatorisch wirken kann (108–111). Eine seiner wichtigsten Funktionen für den Körper ist die Verteidigung gegen Krankheitserreger (112). Hierbei sind TNF α und der TNFR1 beispielsweise in der Entwicklung der lymphatischen Organe bei der Entwicklung von follikulären dendritischen Zellen von Bedeutung (6). Die Hauptproduzenten von TNF α sind bei entzündlichen Erkrankungen zwar Monozyten, Makrophagen und aktivierte T-Zellen, es kann aber von vielen weiteren Zellen, wie auch B-Zellen, NK-Zellen, Mastzellen, neutrophilen Granulozyten, Fibroblasten usw. produziert werden (111, 112). Zunächst liegt das Protein in der membrangebundenen Form vor, wo es dann durch Metalloproteinasen abgespalten werden und als lösliches TNF α in den Extrazellulärraum freigesetzt werden kann (112). TNF α kann über seine

zwei verschiedenen Rezeptoren TNFR1 (auch p55TNFR genannt) und TNFR2 (auch p75TNFR genannt) Signale für Zellwachstum und -differenzierung, aber auch Signale, die zur Apoptose führen, übermitteln (111, 113–115). TNFR1 wird sowohl von Immunzellen, als auch von Nicht-Immunzellen exprimiert (6). Unter anderem über seine Wirkung an Zellen des Immunsystems spielt es eine wichtige Rolle bei der Orchestrierung der Immunreaktion (111). Studien mit Rezeptor-*Knockout*-Mäusen haben gezeigt, dass über TNFR1 eher zytotoxische und proinflammatorische Signale übermittelt werden, während über TNFR2 die Zellaktivierung und -proliferation ausgelöst wird, wobei die Signalwege noch nicht vollständig verstanden sind (112, 115). An menschlichen Zellen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass der TNF α -induzierte Zelltod zwar durch anti-TNFR1-Antikörper, nicht aber durch anti-TNFR2-Antikörper gehemmt wird (114), so dass TNF α wohl hauptsächlich über TNFR1 apoptotisch zu wirken scheint. TNFR2 hat zudem im Vergleich zu TNFR1 keine Todesdomäne an der intrazellulären Region (116). In einer Studie zu T_{reg} am Mausmodell wurde mit rekombinantem TNF α über TNFR2 die T_{reg}-Differenzierung gefördert, während TNFR1 die Differenzierung proinflammatorischer T-Zellen stimulierte (110). Über TNFR1 kann je nach Bedingung entweder über die Bindung des Fas-assoziierten DD-Proteins (FADD) und die Aktivierung von Caspase 8 die Apoptose oder Nekroptose induziert werden, oder aber auch über den NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated b cells*)-Signalweg die Produktion antiapoptotischer Proteine gefördert werden, wobei es hier nach Bindung an den Rezeptor weitere komplizierte Regulationsmechanismen zu geben scheint (112, 115–117). Dass TNFR1 auf B-Zellen exprimiert wird, konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden (118–120). Zudem weiß man, dass TNF α zur Proliferation und Differenzierung von B-Zellen sowie deren IgG-Produktion führt, was wiederum durch anti-TNF α -Antikörper gehemmt werden kann (120–124). Eine Aktivierung von B-Zellen kann zudem zu einer TNF α -Ausschüttung durch diese selbst führen (121, 122). Bei SLE-Patienten wurden erhöhte TNF α -Spiegel im Blutplasma im Vergleich zu gesunden Probanden festgestellt (46). Die Rolle von TNF α bei SLE ist jedoch weiterhin nicht vollständig geklärt (125).

1.3 Die Rolle von Adenosin

Das Purinnukleosid Adenosin ist ubiquitär vorhanden und hat wichtige Funktionen im Energiehaushalt des Körpers sowie in der Regulierung von Gewebefunktionen, insbesondere bei erhöhtem Energiebedarf (126–128). Es spielt eine Rolle in vielen Bereichen des menschlichen Körpers, wie z. B. im kardiovaskulären System, Nervensystem und Immunsystem (127, 129). Seine Konzentration im Extrazellulärraum liegt normalerweise bei etwa 30-300 nM (127). Diese hängt von der Ausschüttung aus Zellen und

dem Abbau des Botenstoffes ATP über Ektonukleotidasen ab (127, 130, 131). Die wichtigsten Faktoren in der Metabolisierung von ATP sind die an der Zelloberfläche vorhandenen Enzyme CD39 (Ekto-Nukleosidtriphosphat-Diphosphohydrolase 1 oder kurz E-NTPDase 1), das dazu dient ATP zu ADP (Adenosindiphosphat) und anschließend zu AMP umzuwandeln, sowie das CD73 (Ekto-5'-Nukleotidase), welches das entstandene AMP zu Adenosin dephosphoryliert (132). In gesundem Gewebe sind die Adenosinspiegel niedrig, während unter pathophysiologischen Bedingungen, wie beispielsweise bei Gewebehypoxie während Entzündungsreaktionen, vermehrt ATP vorhanden ist, sodass vermehrt Adenosin über den Abbau von ATP entsteht und dadurch seine Extrazellulärspiegel ansteigen (127, 128, 132, 133). Adenosin weist einen insgesamt antiinflammatorischen Effekt auf (132). Wenn sich das Gleichgewicht verschiebt, kommen entsprechende bidirektionale Adenosintransporter zum Einsatz, die das Adenosin nach Intra- oder Extrazellulär transportieren können, um das Gleichgewicht wiederherzustellen (126, 127, 130). Das intrazellulär vorhandene Adenosin kann entweder über die Adenosinkinase (AK) zu AMP phosphoryliert werden, um dann zu ATP umgewandelt zu werden, das dann beispielsweise für die Zellmotilität oder aktive zelluläre Transportmechanismen von Bedeutung ist, oder über die Adenosindesaminase (ADA), die es sowohl intra- als auch extrazellulär gibt, zu Inosin deaminiert werden (129, 134–136).

Das extrazelluläre Adenosin wirkt über seine vier verschiedenen G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die aus sieben Transmembrandomänen bestehen und fast auf jeder Körperzelle exprimiert werden, den A1-Rezeptor (A1R), A2A-Rezeptor (A2AR), A2B-Rezeptor (A2BR) und den A3-Rezeptor (A3R) (126, 128, 133). Die Rezeptoren unterscheiden sich in ihrer Affinität für Adenosin sowie in ihren Funktionen bzw. in der Art von G-Proteinen, die sie rekrutieren, und somit im weiteren Signalweg, der an der Zielzelle ausgelöst wird (126, 128). Hierbei wirken A1R und A3R hemmend auf die Adenylatzyklase-Aktivität, während diese über A2AR und A2BR stimuliert wird, wodurch vermehrt cAMP entsteht (126, 128). Für die Wirkung des Adenosins spielen sowohl die Rezeptordichte als auch die Funktionalität der Rezeptoren eine Rolle (133).

Der A1R ist ein $G_{i/o}$ -Protein-gekoppelter Rezeptor und kann sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Wirkungen auf Immunzellen haben (136). In einer Studie an Mäusen konnte gezeigt werden, dass die altersassoziierte Zunahme proinflammatorischer Zytokine wie $TNF\alpha$ und IL-6 bei A1R-positiven Mäusen im Vergleich zu A1R-*knockout* Mäusen statistisch signifikant erhöht waren (137, 138), sodass hier eine tendenziell proinflammatorische Wirkung postuliert wurde. Im Gegensatz hierzu konnte in einer anderen an Mäusen durchgeführten Studie, die sich mit experimenteller

allergischer Enzephalomyelitis befasste, bei A1R-negativen Mäusen eine verstärkte Symptomatik und erhöhte Makrophagenaktivität festgestellt werden (139).

Über die beiden G_s-Protein-gekoppelten Rezeptoren A2AR und A2BR kommt es unter anderem über Aktivierung der Adenylatzyklase zur Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration und Aktivierung der PKA (Proteinkinase A), wobei es auch Unterschiede zwischen den zwei Rezeptoren in den weitergegebenen Signalen gibt (127, 140). Die Aktivierung von ERK1/2 (*extracellular regulated kinases 1/2*) verläuft beispielsweise beim A2BR im Gegensatz zum A2AR unabhängig von der PKA (141). Der A2AR scheint derjenige zu sein, der die Lymphozytenfunktion am stärksten beeinflusst (142). Es konnte in einer Studie an Mäusen bei Kollagen-induzierter Arthritis über einen A2AR-Agonisten die Symptomatik verbessert werden sowie die Plasmaspiegel proinflammatorischer Zytokine, wie u.a. IL-6 und TNF α , reduziert werden (143). Auch bei SLE-Patienten konnte über eine A2AR-Aktivierung eine verminderte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine beobachtet werden (144). Beim A2BR konnten sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkungen festgestellt werden (136). Am Beispiel chemisch induzierter Colitis bei Mäusen konnte in einer Studie gezeigt werden, dass sich A2BR-Agonisten protektiv auf Gewebeschäden im distalen Colon auswirken (136, 145), während eine andere Studie eine verminderte Krankheitsaktivität bei Mäusen ohne A2BR feststellte und hier somit eine proinflammatorische Rolle des A2BR vermutet wurde (146).

Auf den A3R und seine Signalwege soll im Folgenden aufgrund seiner Relevanz für diese Arbeit genauer eingegangen werden.

1.3.1 Der A3-Adenosinrezeptor

Der A3R als G-Protein gekoppelter Rezeptor ist, wie alle Adenosinrezeptoren, durch sieben Transmembrandomänen und eine intrazelluläre C-terminale Region charakterisiert (147, 148). Seine Stimulation führt zu Aktivierung von G_{i/o}-Proteinen und G_q-Proteinen, wodurch es zur Regulierung verschiedener intrazellulärer Signalwege kommt (136, 149, 150). Über die bereits erwähnte Hemmung der Adenylatzyklase und der daraus resultierenden sinkenden cAMP-Spiegel kommt es zur Herunterregulation der PKA (136, 148, 150, 151). Da es hierdurch zu einer Hemmung der PKB (Proteinkinase B) kommt, wird hierüber der NF- κ B-Signalweg ebenfalls herunterreguliert (150, 152–154). Dies wurde beispielsweise am Modell von Ratten mit rheumatoider Arthritis gezeigt, in denen zusätzlich eine erhöhte Expression des proapoptotischen Proteins Caspase-3 und eine verminderte TNF α -Konzentration festgestellt werden konnte (150, 153). NF- κ B ist ein wichtiger proinflammatorisch wirkender Transkriptionsfaktor (155, 156). So

konnte bei rheumatoider Arthritis durch eine Hemmung der Bindung von NF- κ B an die DNA auch eine Verminderung der Chemokinausschüttung und Gelenkszerstörung beobachtet werden (156). Abgesehen von diesem Signalweg kann die G_q-Protein-gekoppelte Aktivierung der PLC (Phospholipase C) stattfinden, wodurch es zur Erhöhung der Calciumspiegel mit Aktivierung der PKC (Proteinkinase C) kommt (136, 157, 158). Darüber hinaus stellte man fest, dass es über eine Stimulierung des A3R zur Phosphorylierung von ERK1/2 kommt, welche zu den MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) gehören, wodurch ebenfalls Zellproliferation, Zelldifferenzierung und das Überleben der Zelle reguliert werden können (136, 159, 160). Die verschiedenen Mechanismen sind in Abb. 2 resümierend dargestellt.

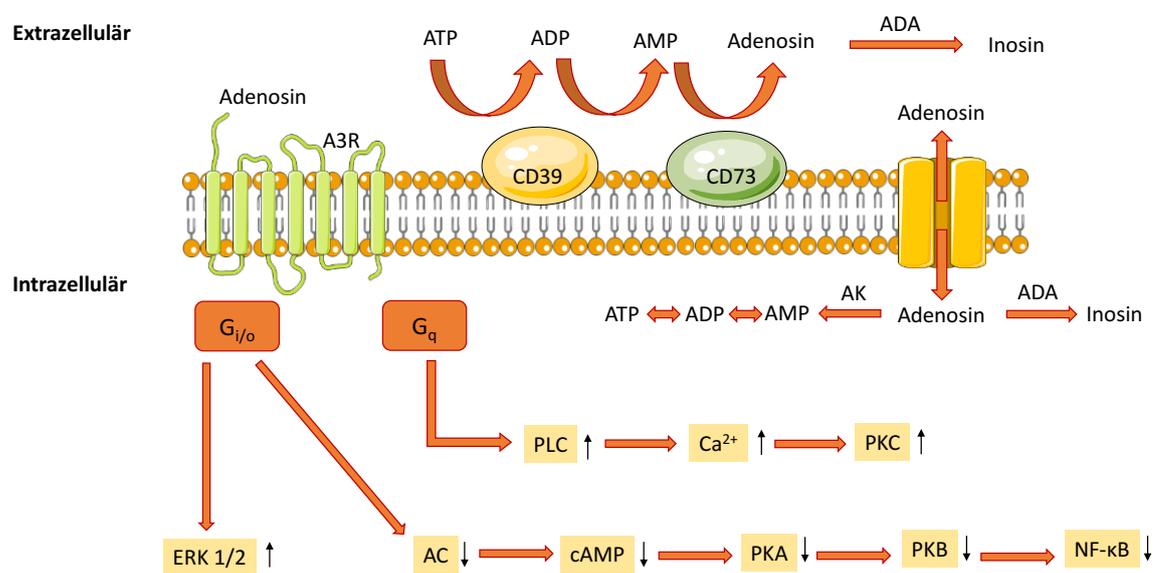


Abb. 2: Schematische zusammenfassende Darstellung des Adenosinmetabolismus, sowie der Signaltransduktion über den A3-Adenosinrezeptor (A3R)

Dargestellt ist der Abbau von Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosinmonophosphat (AMP) über das CD39 (Ekto-Nukleosidtriphosphat-Diphosphohydrolase 1) und die anschließende Dephosphorylierung zu Adenosin über das CD73 (Ekto-5'-Nukleotidase). Zudem sind die Umwandlung zu Inosin über die Adenosin-desaminase (ADA) und die über die Adenosinkinase (AK) stattfindende intrazelluläre Umwandlung von Adenosin zu AMP nach Aufnahme über den Adenosintransporter dargestellt. Der A3R mit seiner Signaltransduktion über das G_{i/o}-Protein und G_q-Protein ist ebenfalls schematisch dargestellt. PLC = Phospholipase C, Ca²⁺ = Calcium, PKC = Proteinkinase C, ERK1/2 = extracellular regulated kinases 1/2, AC = Adenylatzyklase, cAMP = zyklisches AMP, PKA = Proteinkinase A, PKB = Proteinkinase B, NF- κ B = *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells*. Teile der Abbildung wurden unter Benutzung von Servier Medical Art erstellt. Servier Medical Art von Servier ist unter "Creative Commons Attribution 3.0 Unported License" lizenziert (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>)

Der A3R wird auf den verschiedensten Zellen des Immunsystems, wie neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen exprimiert (136, 151, 161). Die Effekte, welche über den A3R im Rahmen der Immunantwort ausgelöst werden, sind vielseitig. Es wurde beispielsweise festgestellt, dass Adenosin über den A3R

verstärkend auf die Migration neutrophiler Granulozyten wirkt (162, 163), und es auch eine Rolle bei der Chemotaxis von dendritischen Zellen spielt (140). Im Mausmodell sah man, dass A3R-Agonisten die IL-10-Produktion erhöhen und zugleich die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IL-12 und IFN γ hemmen können (164). Zudem konnte ebenfalls am Mausmodell gezeigt werden, dass über Aktivierung des A3R die TNF α -Produktion an Mikrogliazellen gehemmt werden kann (154). Der A3R ist für Therapieentwicklungen besonders interessant, da er in Tumorzellen und auch bei inflammatorischen Prozessen überexprimiert wird, sodass aktuell verschiedene A3R-Agonisten für therapeutische Zwecke erforscht werden (128, 162). In Studien an rheumatoider Arthritis konnte über A3R-Agonisten eine Verbesserung der klinischen Symptomatik erreicht werden (153, 165). Auch bei Colitis ulcerosa zeigte sich eine protektive Wirkung von A3R-Agonisten im Mausmodell mit Verbesserung der klinischen Symptomatik und Hemmung proinflammatorischer Zytokine, wie beispielsweise IL-1, IL-6 und IL-12 (166). Beim systemischen Lupus Erythematoses sowie auf B-Zellen allgemein ist der A3R jedoch noch weitgehend unerforscht.

1.4 Ziele dieser Arbeit

Die Grundlagen zu regulatorischen B-Zellen mit ihren verschiedenen Mechanismen und unterschiedlich definierten Populationen, sowie die Funktion der hierbei relevanten Zytokine, wurden in den vorherigen Abschnitten ausführlich erläutert. Die Ziele dieser Arbeit können in drei Bereiche eingeteilt werden. Zunächst sollen die B-Zellen aus Lupuspatienten und gesunden Kontrollen auf möglicherweise bestehende numerische Unterschiede in definierten B_{reg}-Populationen untersucht werden und anschließend mittels quantitativer *real time* PCR Unterschiede in der mRNA-Expression der beschriebenen Zytokine herausgearbeitet werden. Im letzten Teil der Arbeit soll dann, nach vorheriger Untersuchung seiner mRNA-Expression, der A3R auf B-Zellen bezüglich seiner Funktion unter Anwendung von A3R-Agonisten und -Antagonisten in Zellkulturen untersucht werden.

2 Materialien und Methoden

Alle Materialien wurden den Herstellerangaben getreu verwendet.

2.1 Materialien

Bezeichnung	Firma	Hauptsitz der Firma
BD Vacutainer Safety-Lock Blutentnahmeset	BD	Franklin Lakes, USA
BD Vacutainer K2E (EDTA), 10 ml	BD	Franklin Lakes, USA

Leucosep <i>TUBE</i> , 50 ml	Greiner Bio-one	Kremsmünster, Oberösterreich
Lymphoprep <i>Solution</i>	Axis Shield	Dundee, UK
Cellstar <i>TUBES</i> , 50 ml	Greiner Bio-one	Kremsmünster, Oberösterreich
Cellstar <i>TUBES</i> , 15 ml	Greiner Bio-one	Kremsmünster, Oberösterreich
Ampuwa Spüllösung, 1000 ml	Fresenius	Bad Homburg, Deutschland
<i>Red Blood cell Lysis solution (10 x)</i>	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>autoMACS Running Buffer</i>	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>Glass Pasteur Pipettes</i>	BRAND GMBH	Wertheim, Deutschland
<i>Safe-lock-Tubes 1,5 ml</i>	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
<i>Safe-lock-Tubes 2 ml</i>	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
<i>Recovery Cell Culture Freezing Medium</i>	Thermo Fisher scientific	Waltham, Massachusetts, USA
CRYO.S, PP, <i>with screw cap, sterile</i>	Greiner Bio-one	Kremsmünster, Oberösterreich
<i>CoolCell Freezing container</i>	Biocision	Mill Valley, California
<i>Clearly Safe DuraPorter Sample Carrier</i>	Heathrow Scientific LLC	Vernon Hills, IL, USA

Tabelle 1: Materialien für die Blutabnahme und PBMC-Isolierung

Bezeichnung	Firma	Hauptsitz der Firma
Penicillin/Streptomycin (Pen Strep)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
<i>Fetal Bovine Serum, heat-inactivated</i>	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
<i>Insulin solution human [10 mg/ml]</i>	SIGMA-ALDRICH	St. Louis, Missouri, USA
<i>Pan B Cell Isolation Kit, human</i>	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>MS Columns</i>	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>LS Columns</i>	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland

<i>Pre-Separation Filters (30 µm)</i>	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>96- well Suspension Culture Plate, sterile, U-bottom, with lid</i>	Greiner Bio-one	Kremsmünster, Oberösterreich
<i>MACS Quant Running Buffer</i>	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>Propidium Iodide Solution</i>	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>RPMI 1640 Medium, GlutaMAX Supplement, HEPES</i>	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA

Tabelle 2: Materialien für die B-Zell Isolierung

Bezeichnung	Klon	Konjugat	Verdünnung	Hersteller	Herstellersitz
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
<i>Mouse IgG1</i>	IS5-21F5	Vio-Blue	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland

<i>Mouse IgG1</i>	IS5-21F5	FITC	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>Mouse IgG1</i>	IS5-21F6	PE	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>Mouse IgG1</i>	IS5-21F7	PerCPVio700	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>Mouse IgG2b</i>	S43.10	APC	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>Mouse IgG2b</i>	S43.10	APCVio770	01:11	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>FcR Blocking Reagent</i>	-	-	01:05	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Propidium-Jodid	-	-	0,111111111	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland

Tabelle 3: Reagenzien für die Durchflusszytometrie

Bezeichnung	Hersteller	Herstellersitz
<i>Nuclease-free water</i>	Thermo Fisher scientific	Waltham, Massachusetts, USA
2 Mercaptoethanol	Merck	Darmstadt, Deutschland
<i>Ethanol for molecular biology</i>	Merck	Darmstadt, Deutschland
<i>Sigma Rnase away</i>	Roth	Karlsruhe, Deutschland
<i>Buffer RLT Lysis Buffer</i>	Qiagen	Venlo, Niederlande
<i>QiaShredder Mini Spin Column</i>	Qiagen	Venlo, Niederlande
<i>Rneasy MinElute Spin Column</i>	Qiagen	Venlo, Niederlande
<i>Buffer RW1 wash buffer</i>	Qiagen	Venlo, Niederlande
<i>Rnase-Free Dnase Set</i>	Qiagen	Venlo, Niederlande
<i>Rnase-Free Dnase Set</i>	Qiagen	Venlo, Niederlande

<i>Buffer RPE wash Buffer 11 ml concentrate</i>	Qiagen	Venlo, Niederlande
<i>Collection tubes (2 ml)</i>	Qiagen	Venlo, Niederlande
<i>Collection tubes (1,5 ml)</i>	Qiagen	Venlo, Niederlande
<i>Precision wipes</i>	KIMTECH Science	Roswell, USA
<i>Quantitative PCR Human Reference Total RNA, 25 µg</i>	Agilent	Santa Clara, USA
<i>Tube Strips with single flat caps</i>	Nippon Genetics Europe GMBH	Düren, Deutschland
<i>iScript gDNA Clear cDNA Synthesis Kit</i>	Bio-Rad Laboratories	Hercules, California, USA
<i>iScript gDNA Clear cDNA Synthesis Kit</i>	Bio-Rad Laboratories	Hercules, California, USA
<i>iScript gDNA Clear cDNA Synthesis Kit</i>	Bio-Rad Laboratories	Hercules, California, USA
qPCR BIO SyGreen Mix Hi-ROX	PCR Biosystems	London, UK
<i>Fast Gene Fast 96 well PCR plate</i>	Nippon Genetics Europe GMBH	Düren, Deutschland
PCR 96 Well rack	SIGMA-ALDRICH	St. Louis, Missouri, USA
<i>adhesive clear qPCR Seals, sheets 141 x 80 mm</i>	Nippon Genetics Europe GMBH	Düren, Deutschland

Tabelle 4: Verwendete Materialien bei der RNA-Isolation, cDNA-Synthese und PCR

Primer	Sequenz	HT	Hersteller	Hauptsitz
IL21-Rezeptor, <i>human forward</i>	5'CGGTTCTTCATGCCCTGTA3'	62°C	Eurofins	Luxemburg
IL21-Rezeptor, <i>human reverse</i>	5'GCTGGTTCTGTAGCTCCGT3'	62°C	Eurofins	Luxemburg
TNFalpha Rezeptor, <i>forward</i>	5'TGTACCA-AGTGCCACAAAGGA3'	60°C	Eurofins	Luxemburg
TNFalpha Rezeptor, <i>reverse</i>	5'CTTTCGGCATTGGAGCAGC3'	60°C	Eurofins	Luxemburg
IL-10, <i>forward (3)</i>	5'CGAGATGCCTTCAGCAG3'	64°C	Eurofins	Luxemburg
IL-10, <i>reverse (3)</i>	5'CGCCTTGATGTCTGGGTCTT3'	64°C	Eurofins	Luxemburg
TGFbeta1, <i>forward</i>	5'TACAGCAACAATTCCTGGCG 3'	60°C	Eurofins	Luxemburg
TGFbeta1, <i>reverse</i>	5'AAGCCCTCAATTCCTCC3'	60°C	Eurofins	Luxemburg

Interferon alpha 1, <i>forward</i>	5'AACATCTGGTCCAACAT-GAAAAC3'	60 °C	Eurofins	Luxemburg
Interferon alpha 1, <i>reverse</i>	5'AGTTATAGCAGGGGT-GAGAGTC3'	60 °C	Eurofins	Luxemburg
EBI-3, <i>forward</i>	5'ATCCGTTACAAGCGTCAGGG3'	66 °C	Eurofins	Luxemburg
EBI-3, <i>reverse</i>	5'TCCCCGTAGTCTGTGAGGTC3'	66 °C	Eurofins	Luxemburg
IL-12A, <i>forward</i>	5'GTGTCACCGAGAAGCTGATG3'	62 °C	Eurofins	Luxemburg
IL-12A, <i>reverse</i>	5'TTATAATTGTCCCGAGGCGC3'	62 °C	Eurofins	Luxemburg
B2M, <i>forward</i>	5'AGTATGCCTGCCGTGTGAA3'	62 °C	TIB MOL-BIOL	Berlin, Deutschland
B2M, <i>reverse</i>	5'TCATCCAATCCAAATGCGGC3'	62 °C	TIB MOL-BIOL	Berlin, Deutschland
Adora3, <i>forward</i>	5'TGTCACCTTCCTTTCATGCC3'	62 °C	TIB MOL-BIOL	Berlin, Deutschland
Adora3, <i>reverse</i>	5'TGTCAAGATAGATGGCGCAC3'	62 °C	TIB MOL-BIOL	Berlin, Deutschland

Tabelle 5: Verwendete Primer (HT = Hybridisierungstemperatur)

Bezeichnung	Hersteller	Herstellersitz
RPMI 1640 Medium + GlutaMAX	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
<i>Fetal Bovine Serum, heat inactivated</i>	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
<i>Insulin solution human</i>	SIGMA-ALDRICH	St. Louis, Missouri, USA
Pen 10000 U/ml, Strept 10000 µg/ml [100x]	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Cellstar TUBES, 50 ml	Greiner Bio-one	Kremsmünster, Oberösterreich
autoMACS Running Buffer	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
CD19 Microbeads, human, 2 ml	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland

Cellstar <i>TUBES</i> , 15 ml	Greiner Bio-one	Kremsmünster, Oberösterreich
MS <i>Columns</i>	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
LS <i>Columns</i>	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>Pre-Separation Filters</i> (30 µm)	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>Propidium Iodide Solution</i>	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
CpG ODN2006 (<i>human</i>) 3,85 m/ml (500 µM)	Invivo Gen	San Diego, USA
2-CI_IB-MECA	Tocris	Bristol, UK
PSB 10 <i>hydrochloride</i>	Tocris	Bristol, UK
24 <i>Well Culture Plate, sterile, with lid</i>	Greiner Bio-one	Kremsmünster, Oberösterreich
Dulbecco's <i>Phosphate Buffered Saline</i>	SIGMA-ALDRICH	St. Louis, Missouri, USA
LAL <i>reagent water</i>	Lonza Bioscience	Basel, Schweiz
eBioscience <i>Cell ProliferationDye eFluor450</i>	Thermo Fisher Sci- entific	Waltham, MA, USA
<i>Safe-lock-tubes</i> 1,5 ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
<i>Safe-lock-tubes</i> 2 ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
96 <i>Well Culture Palte, sterile, F-bottom, with lid</i>	Greiner Bio-one	Kremsmünster, Oberösterreich
96- <i>well Suspension Culture Plate, sterile, U-bottom, with lid</i>	Greiner Bio-one	Kremsmünster, Oberösterreich
10/20 µl XL <i>Graduated Filter Tip</i>	Starlab Deutsch- land GmbH	Hamburg, Deutschland
200 µl <i>Graduated Filter Tip, Refill</i>	Starlab Deutsch- land GmbH	Hamburg, Deutschland
1000 µl XL <i>Graduated Filter Tip, Refill</i>	Starlab Deutsch- land GmbH	Hamburg, Deutschland
10/20 µl XL <i>Graduated Tip</i>	Starlab Deutsch- land GmbH	Hamburg, Deutschland
200 µl <i>Bevelled Tip</i>	Starlab Deutsch- land GmbH	Hamburg, Deutschland
1000 µl <i>Graduated Tip</i>	Starlab Deutsch- land GmbH	Hamburg, Deutschland

10/20 µl XL RPT <i>Filter Tip</i>	Starlab Deutschland GmbH	Hamburg, Deutschland
100 µl RPT <i>Filter Tip</i>	Starlab Deutschland GmbH	Hamburg, Deutschland
1000 µl XL RPT <i>Filter Tip</i>	Starlab Deutschland GmbH	Hamburg, Deutschland
5 ml Stripette	SIGMA-ALDRICH	St. Louis, Missouri, USA
10 ml Stripette	SIGMA-ALDRICH	St. Louis, Missouri, USA
25 ml Stripette	SIGMA-ALDRICH	St. Louis, Missouri, USA
CD4-FITC, <i>human</i>	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
CD8-APC, <i>human</i>	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>Mouse IgG1 -FITC, 1 ml</i>	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
REA <i>Control(S) -APC human 1 ml</i>	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
eBioscience <i>Anti-human CD3</i>	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
eBioscience <i>Anti-human CD28</i>	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
CD19-FITC, <i>human</i>	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
REA-FITC	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland

Tabelle 6: Verwendete Materialien für die Zellkulturen und Suppressionsassays

Bezeichnung	Gerätename	Hersteller	Herstellersitz
Absaugsystem	<i>Aspirator with trap flask</i>	Kisker Biotech	Steinfurt, Deutschland
Autoklav	Systec VX-55	Systec	Linden, Deutschland
Durchflusszytometriegerät	MACS <i>Quant Analyzer 10</i>	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 <i>no frost</i> (4 °C)	Liebherr	Biberach an der Riß, Deutschland
Kühlschrank	Thermo Fisher SIN8231413973 (-80 °C)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Multikanal-Pipette	Transferpette-8 (50-200 µl)	Brand	Wertheim, Deutschland
Mini-Zentrifuge	Mini <i>centrifuge model</i> NG002B	Nippon Genetics Europe GMBH	Düren, Deutschland
Multikanal-Pipette	Xplorer (50-1200 µl)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Neubauer-Zählkammer, Tiefe 0,1 mm, 0,0025 mm	Brand	Wertheim, Deutschland
Parafilm	Parafilm	Bemis	Neenah, WI, USA
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	LaminAir HB2472	Heraeus Med GmbH	Meerbusch, Deutschland
Wasserbad	985329	Köttermann	Uetze/Hänigsen, Deutschland
MACS Quant Analyzer 10	130-096-343	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland

Vortexer	Reax 2000	Heidolph Instruments	Schwabach, Deutschland
Brutschrank	Typ BB16CU, Bestell Nr. 51008333	Heraeus Medical	Hanau, Deutschland
Stickstofftank	0092-231-783-9	Messer Group GmbH	Bad Soden am Taunus, Deutschland
OctoMACS™ Separator	130-042-109	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
QuadroMACS™ Separator	130-090-976	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
kleines Absaugsystem	FTA-1 Aspirator with trap flask	Keison Products	Chelmsford, UK
Thermocycler PeqLab	PeqSTAR 96X Universal	Peqlab	Erlangen, Deutschland
Kühlplatte	PCR-cooler 0,2 ml	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Sicherheitswerkbank Type HS 18	51017272	Kendro laboratory products	Hanau, Deutschland
Zentrifuge	Hettich 220R Micro centrifuge, REF: 2205	Hettich Zentrifugen	Tuttlingen, Deutschland
PCR System	SteponePlus Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Zentrifuge	Mini-Plate centrifuge NG040	Nippon Genetics Europe GMBH	Düren, Deutschland

Tabelle 7: Geräte

2.2 Blutprobengewinnung

Für die Studie wurden insgesamt 43 an systemischem Lupus Erythematoses erkrankte Probanden rekrutiert, die sich entweder in Remission befanden oder eine maximal moderate Krankheitsaktivität zeigten (SLEDAI maximal 8). Von der Studie ausgeschlossen wurden Minderjährige und Patienten, die innerhalb der letzten 6 Monate eine B-Zell-supprimierende Therapie (Rituximab, Belimumab, Cyclophosphamid) erhalten hatten sowie alle Patienten, die kein Einverständnis gaben. Keiner der Patienten befand sich aus klinischer Sicht in aktivem Krankheitszustand. Im Rahmen der Routineuntersuchung in der rheumatologischen Ambulanz des Universitätsklinikums Düsseldorf (Moorenstraße 5, 40225 Düsseldorf) wurde den Patienten zusätzlich zur standardmäßigen Blutabnahme durch den Ambulanzarzt bzw. die Ambulanzärztin etwa 30-40 ml Blut

über ein *BD Vacutainer Safety-Lok* Blutentnahmeset aus einer peripheren Vene entnommen. Hierüber wurden die Probanden im Vorfeld aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Das in *BD Vacutainer EDTA Plus* Röhrchen gelagerte Blut wurde anschließend in einer sicheren Transportbox (*Clearly Safe DuraPorter Sample Carrier*, Heathrow Scientific LLC, Vernon Hills, IL, USA) aus der rheumatologischen Ambulanz des Universitätsklinikums Düsseldorf in das Hiller-Forschungszentrum für Rheumatologie (*Life Science Center*, Merowingerplatz 1a, 40225 Düsseldorf) transportiert, wo es unverzüglich weiterverarbeitet wurde. Von den 43 Blutproben wurden 30 für die Analyse der B-Zellen und 13 für die Etablierung und Durchführung der Suppressionsassays verwendet (Ethikvotum 5714R, s. Punkt 2.6).

Als gesunde Kontrollen wurden 37 *Buffy Coats* aus Vollblut von gesunden Spendern im Alter zwischen 18 und 68 Jahren von der Blutspendezentrale des Universitätsklinikums Düsseldorf kommerziell erworben. Eine schriftliche Einverständniserklärung zur Verwendung des Blutes für medizinische Forschungszwecke lag hierbei vor. Von den 37 *Buffy Coats* wurden 30 als gesunde Kontrollen für die B-Zell Analyse und 7 für die Etablierung und Durchführung der Suppressionsassays verwendet.

2.3 PBMC-Separation

Aus den Blutproben wurden mittels Dichtegradienten-Zentrifugation die peripheren mononukleären Zellen (PBMC) von den Granulozyten und Erythrozyten getrennt. Hierfür wurden die Angaben des Herstellers befolgt sowie bei Raumtemperatur unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Zunächst wurden die Leucosep[®] Röhrchen mit 15 ml Separationsmedium (*Lymphoprep Solution*) befüllt und 30 s lang bei 1000 x g zentrifugiert. Dadurch sammelte sich das Separationsmedium unterhalb der Trennmembran an und die Vollblutprobe konnte direkt auf die Membran gegeben werden. Es wurden maximal 30 ml Blut in einem Leucosep[®] Röhrchen verarbeitet. Die Blutprobe wurde zuvor in einem Verhältnis von 1:2 mit *AutoMACS Running Buffer* verdünnt, um ein besseres Ergebnis zu erzielen. Im Anschluss wurde das Leucosep[®] Röhrchen verschlossen und 20 min lang bei 800 x g ohne Bremse zentrifugiert. Durch die unterschiedliche Dichte der Blutbestandteile bildete sich auf diese Weise unterhalb der Trennmembran eine Schicht aus Erythrozyten und Granulozyten und oberhalb der Membran ein Ring aus PBMC. Nach vorsichtiger Abnahme des überschüssigen Plasmas wurde dieser Ring in ein neues 50 ml *tube* pipettiert, mit *Running Buffer* aufgefüllt und einmalig bei 250 x g zentrifugiert. Um möglicherweise übrig gebliebene Erythrozyten zu lysieren, wurden 5 ml der nach Herstellerangaben verdünnten *Red Blood Cell Lysis Solution* zu 500 µl Zellsuspension gegeben. Die Probe wurde durch Vortexen gemischt, für 10 min bei

Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss zwei Mal für 10 min bei 250 x g gewaschen. Für die Zellzählung wurde eine 1:400 Verdünnung der Probe im MACS Quant Analyzer 10 per Durchflusszytometrie (s. Abschnitt 2.4.2) analysiert. Die Gesamtzellzahl wurde entsprechend der Verdünnung ausgerechnet.

Um den gleichen Ausgangspunkt in der Zellaktivität zu gewährleisten und eine zeitgleiche Verarbeitung mehrerer Proben zu ermöglichen, wurden die PBMC nach der Separation in *Recovery Cell Culture Freezing Medium* eingefroren. Hierfür wurde die Zellsuspension erneut für 10 min bei 250 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das so entstandene Pellet wurde daraufhin in 1,8 ml frisch aufgetautem *Recovery Cell Culture Freezing Medium* resuspendiert und zügig in ein CRYO.S tube überführt, das unter sterilen Bedingungen verschlossen wurde. Die Probe wurde dann unverzüglich im *CoolCell freezing container* bei -80 °C gelagert, wodurch ein gleichmäßiges und langsames Einfrieren von -1 °C pro Minute gewährleistet werden konnte. Nach einer Aufbewahrungszeit von 1-2 Tagen wurde die jeweilige Probe bis zur weiteren Verarbeitung in einem Tank mit flüssigem Stickstoff gelagert.

2.4 B-Zell-Analyse

2.4.1 Isolierung der Pan-B-Zellen mittels MACS (*magnetic cell sorting*)

Für die Isolierung der Pan-B-Zellen wurden die Proben von zwei HC und zwei SLE-Patienten gleichzeitig verarbeitet. Es wurde unter sterilen Bedingungen bei Raumtemperatur gearbeitet.

Zunächst wurde Zellkulturmedium vorbereitet, indem zum GlutaMAX und HEPES beinhaltenden RPMI 1640 Medium 10 % hitzeinaktiviertes FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin und humanes Insulin in einer Konzentration von 5 µg/ml hinzugegeben wurden. Pro Probe wurden 20 ml des vorbereiteten Mediums in ein 50 ml tube gegeben und im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Die jeweilige Probe wurde nach Herausnahme aus dem Stickstoff-Container zunächst kurz im Wasserbad angetaut und anschließend mit dem zuvor erwärmten Zellkulturmedium vermischt. Hierfür wurde der bereits aufgetaute Teil der Zellsuspension mit einer 100-1000 µl Pipette in die 20 ml Zellkulturmedium überführt. Der noch im CRYO.S Gefäß befindliche gefrorene Anteil wurde mit 1000 µl des erwärmten Mediums weiter aufgetaut. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis die gesamte Zellsuspension mit den 20 ml Medium vermischt war. Im Anschluss wurden die Proben bei Raumtemperatur für 10 min bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das entstandene Pellet in 10 ml *Running Buffer* resuspendiert.

Um beim Einfrieren untergegangene Zellen auszuschließen erfolgte zunächst eine erneute Zellzählung. Für die Zellzählung wurden 10 µl dieser Zellsuspension in einem

1,5 ml *tube* mit 390 µl *Running Buffer* vermischt, um so eine 1:40 Verdünnung zu erreichen. Per Durchflusszytometrie (s. Abschnitt 2.4.2) wurde daraufhin mit dem MACS Quant Analyzer 10 die Zellzahl pro ml bestimmt und entsprechend Verdünnung und Gesamtflüssigkeitsmenge die Gesamtzellzahl errechnet ($\times 40 \times 10 \text{ ml}$). Das zur Zellzählung verwendete *tube* wurde verworfen.

Die B-Zell Isolation erfolgte nach Herstellerangaben unter Benutzung des *Pan B Cell Isolation Kit* (Miltenyi Biotec) durch MACS. Hierzu wurde zunächst die 10 ml Zellsuspension 10 min bei 8 °C und 300 x g erneut zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde anschließend entsprechend der jeweiligen Zellzahl in 40 µl kaltem *Running Buffer* pro 10^7 Zellen resuspendiert. Zu je 10^7 Zellen wurden 10 µl des *Pan B-Cell Biotin Antibody Cocktail* hinzugefügt. Dieser enthält Biotin-konjugierte monoklonale Antikörper gegen CD2, CD3, CD4, CD14, CD15, CD16, CD34, CD56, CD61, CD235a (Glycophorin A) und FcεRIα, welche an alle Nicht-B-Zellen binden. Nach Zugabe der Biotin-Antikörper wurde die Probe gevortext und 5 min im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Daraufhin wurden pro 10^7 Zellen 30 µl *Running Buffer* und 20 µl Anti-Biotin *MicroBeads* beigemischt. Diese *MicroBeads* dienen einer magnetischen Markierung der zuvor durch die Biotin-Antikörper gebundenen Zellen. Die Probe wurde anschließend erneut gut durchmischt und für 10 min bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert.

Im nächsten Schritt wurden der OctoMACS Separator mit *MS Columns* (bei $< 10^7$ magnetisch markierten Zellen) oder ein QuadroMACS Separator mit *LS Columns* (bei $> 10^7$ magnetisch markierten Zellen) verwendet. Hierfür wurde die entsprechende Säule zunächst mit einem *Pre-Separation Filter* (30 µm) im Separator platziert und mit 500 µl (*MS Column*) bzw. 3 ml (*LS Column*) *Running Buffer* equilibriert. Der Durchfluss wurde in einem 15 ml *tube* gesammelt und anschließend verworfen. Nach der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension bei zu geringer Flüssigkeitsmenge zunächst auf ein Mindestvolumen von 500 µl aufgefüllt. Die gesamte Zellsuspension wurde anschließend auf den Filter der vorbereiteten Säule pipettiert und der Durchfluss erneut in einem 15 ml *tube* gesammelt. Sobald die Säule sich geleert hatte, wurde sie dreimalig mit 500 µl *Running Buffer* (*MS Column*) bzw. 3 ml *Running Buffer* (*LS Column*) gespült. Dieser war zuvor für das Auswaschen des ursprünglich für die magnetische Markierung verwendeten 50 ml *tubes* genutzt worden, um die Ausbeute an Zellen zu erhöhen. Die Säule mit den depletierten Nicht-B-Zellen wurde verworfen, während aus der B-Zellen-beihaltenden Zellsuspension 10 µl entnommen wurden, um in einer 1: 200 Verdünnung im MACS Quant Analyzer 10 per Durchflusszytometrie (s. Abschnitt 2.4.2) die Zellzahl zu ermitteln. Die Gesamtzellzahl wurde entsprechend der Verdünnung und Gesamtflüssigkeitsmenge ausgerechnet.

Für die spätere Genexpressionsanalyse (s. Abschnitt 2.4.3) wurden an dieser Stelle pro Probe jeweils 400 000 B-Zellen entnommen, auf vier 1,5 ml *tubes* verteilt (jeweils 100 000 B-Zellen) und diese bei 300 x g 10 Minuten lang bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in einer Mischung von 350 µl *Buffer RLT Lysis Buffer* und 2-Mercaptoethanol (Verhältnis 100:1) resuspendiert, um die Zellen für die spätere RNA-Isolation zu lysieren. Die *tubes* wurden bis zur weiteren Verarbeitung der B-Zellen bei -80 °C gelagert.

Für die weitere Analyse mittels Durchflusszytometrie wurden jeweils etwa eine Million B-Zellen entnommen. Übrig gebliebene B-Zellen wurden für zukünftige Projekte bei -80 °C in *Recovery Cell Culture Freezing Medium* eingefroren, und im Anschluss im Stickstoffbehälter gelagert (s. Punkt 2.3).

2.4.2 Durchflusszytometrie (FACS)

2.4.2.1 Prinzip

Bei der Durchflusszytometrie (*FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting*) handelt es sich um ein Verfahren, das eine genaue Analyse verschiedenster Zellen und deren quantitative Bestimmung ermöglicht. Sie wird dazu verwendet die verschiedenen Zell-Subtypen aufgrund Ihrer Morphologie und Größe voneinander zu unterscheiden und genauer zu untersuchen. Hierzu werden die Zellen aus einer Zellsuspension jeweils einzeln durch feinste Kapillaren gesogen und mit einem Laserstrahl beschossen. Je nach Größe und Granularität der Zelle wird der Lichtstrahl dann auf unterschiedliche Weise gebrochen und das entstandene Streulicht über Detektoren (*Photomultiplier*) gemessen. Hierbei unterscheidet man vorwärts gestreutes Licht (*forward scatter = FSC*), dessen Menge einen Parameter für die Zellgröße darstellt, und seitlich gestreutes Licht (*sideward scatter = SSC*), dessen Menge ein Parameter für die Granularität der Zelle ist. Darüber hinaus können über verschiedene Detektoren über unterschiedliche Kanäle Fluoreszenzsignale gemessen werden, sodass durch die Hinzugabe unterschiedlicher fluoreszierender Antikörper eine genaue Analyse der Zellpopulationen und deren Oberflächenmoleküle ermöglicht wird. Über die Verwendung sogenannter Isotypkontrollen für den jeweiligen Farbstoff, die gegen nicht auf den Zellen exprimierte Antigene gerichtet sind, wird die Mitbeurteilung von unspezifischem Hintergrundrauschen vermieden.

2.4.2.2 Durchführung

Von den für die Durchflusszytometrie entnommenen B-Zellen wurden jeweils 100 000 Zellen in 100 µl *Running Buffer* in ein *well* einer 96-well *Suspension Culture Plate* überführt. Die Platte wurde anschließend bei 350 x g 10 min lang bei 4 °C zentrifugiert und

die Überstände abgesaugt. Währenddessen wurde eine 1:10 Verdünnung des FcR (Fc-Rezeptor) *Blocking Reagent* mit MACS Quant *Running Buffer* erstellt, hiervon pro *well* jeweils 20 µl dazugegeben und die B-Zellen hierin resuspendiert, um eine unspezifische Bindung der Antikörper an den FcR der B-Zellen zu verhindern. Die Platte wurde im Anschluss 10 min lang bei 4 °C inkubiert. In die einzelnen *wells* wurden jeweils 1,25 µl pro Antikörper hinzugegeben, um ungefähr eine Verdünnung von 1:22 zu erhalten. Hierbei wurden die Antikörper für die Untersuchung des von Frau Dr. med. Magdalena Siekierka-Harreis erstellten *panels* für die regulatorischen B-Zellen (CD19, CD23, Anti-IgM, CD24, CD5, CD1d und CD11c) sowie die jeweiligen Isotypkontrollen (s. Materialliste) jeweils in unterschiedliche *wells* gegeben, sodass sich pro Probe am Ende zwei auf gleiche Weise gefüllte *wells* ergaben. Die Isotypkontrolle erfolgte anhand der Probe des gesunden Probanden. Der Inhalt wurde durch wiederholtes Pipettieren gut vermengt und die Platte 10 min lang bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden pro *well* 200 µl MACS Quant *Running Buffer* hinzugegeben und die Platte für 10 min bei 350 x g und 4 °C zentrifugiert, um die überschüssigen nicht gebundenen Antikörper auszuwaschen. Der Überstand wurde abgesaugt und pro *well* erneut 200 µl MACS Quant *Running Buffer* hinzugefügt.

Mit dem MACS Quant *Analyzer 10* wurde daraufhin bei Raumtemperatur die durchflusszytometrische Analyse durchgeführt.

Vor der ersten Messung wurde eine Kompensation für die Fluoreszenzfarbstoffe nach Anfärben der B-Zellen vorgenommen, um die Strahlung der verschiedenen Fluorochrome in die nicht dem jeweiligen Farbstoff zugehörigen Kanäle herauszurechnen und eine genaue Auswertung zu ermöglichen.

2.4.2.3 Durchflusszytometrische Gating-Strategie und Auswertung

Die durchflusszytometrischen Daten wurden mit der Software Flowlogic (Version MACS Miltenyi Biotec) ausgewertet. Hierfür wurde ein sogenanntes Gating durchgeführt. Hierbei werden anhand der Isotypkontrollen Schwellenwerte für diejenigen Merkmale gesetzt, die betrachtet und ausgewertet werden sollen. Die Gating-Strategie, die bei der Auswertung verwendet wurde, ist in Abb.3 aufgeführt.

Die über Flowlogic erhaltenen Zellzahlen für B-Zellen und B_{reg} wurden in Excel übertragen in einen prozentualen Anteil an B-Zellen umgerechnet. Im Anschluss wurde der Mittelwert aus den zwei Proben des jeweils gleichen Patienten gebildet. Die statistische Auswertung und dargestellte Grafiken wurden mit GraphPad Prism 9 erstellt.

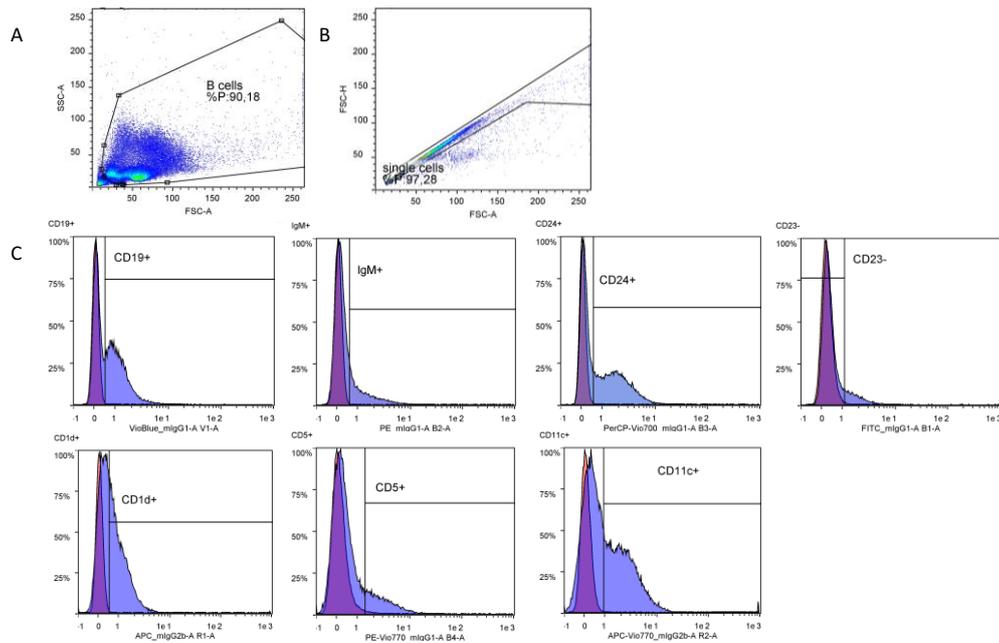


Abb. 3: Gatingstrategie für die B_{reg} (regulatorische B-Zellen). Darstellung mittels Flowlogic

(A) Punktdiagramm mit Darstellung des Gatings der B-Zellen. Herausgaten von Zellfragmenten (niedrigste Bereiche im FSC und SSC).

(B) Punktdiagramm zur Betrachtung nur der *single cells*. Herausgaten von sogenannten *cell-doublers*, welche durch Aneinanderlagerung von zwei *events* entstehen.

(C) Histogramme zur Darstellung des Gatings für die verschiedenen Oberflächenmarker der untersuchten B_{reg}-Populationen (CD19+, IgM+, CD24+, CD23-, CD1d+, CD5+, (CD11c+)). Die *gates* wurden jeweils anhand der Isotypkontrollen (rote überlagerte Histogramme links) mit Toleranz von 1 % Überlappung der Zellen gesetzt. CD = *cluster of differentiation*, Ig = Immunglobulin.

Um die Arbeitshypothese zu untersuchen, dass es Unterschiede in der Zellzahl an regulatorischen B-Zellen in den beiden Gruppen gibt, wurde, da wir nicht von einer Normalverteilung ausgingen, ein non-parametrischer Mann-Whitney U Test verwendet.

2.4.3 Genexpressionsanalyse

Zur weiteren Analyse der Unterschiede in B-Zellen zwischen SLE-Patienten und gesunden Kontrollen sollte zusätzlich die Genexpression der kodierenden Gene für IL-10, IL-35, TGF- β 1, dem IL-21R, IFN α 1, dem TNFR1 und dem A3R untersucht werden. Hierfür musste zunächst die RNA aus den B-Zellen isoliert werden, um dann durch das Enzym Reverse Transkriptase die hierzu komplementäre cDNA zu synthetisieren. Die cDNA wurde schließlich für die Durchführung einer quantitativen RT-PCR verwendet, um Rückschlüsse auf die Expressionsrate der zugrundeliegenden RNA zu ermöglichen.

2.4.3.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation aus den zuvor isolierten B-Zellen wurde mittels RNeasy *Micro Kit* von QIAGEN unter Befolgung der Herstellerangaben im RNeasy *Micro Handbook* bei Raumtemperatur durchgeführt. Vor Beginn der Arbeit wurde der Arbeitsplatz gründlich

mit RNase AWAY gereinigt. Zur Vorbereitung wurden zunächst QIAshredder auf 2 ml *collection tubes* transferiert. Die in einer Mischung von 350 µl *Buffer RLT Lysis Buffer* und 2-Mercaptoethanol lysierten Zellen (s. 2.3.1) wurden für die RNA-Isolation langsam auf Eis aufgetaut und das Lysat direkt auf die Membran eines QIAshredder überführt, um eine Homogenisierung der Probe zu gewährleisten. Im Anschluss wurden die Proben 2 min lang bei 14 000 rpm und 18 °C zentrifugiert. Die QIAshredder wurden verworfen und zum Lysat wurden 350 µl 70 %iger Ethanol hinzugegeben (Verhältnis 1:1) und mit der Pipette gut vermischt. Diese 700 µl Lysat wurden anschließend auf eine RNeasy MinElute *Spin Column* gegeben, die zuvor in einem 2 ml *collection tube* platziert worden war. Bei geschlossenem Deckel erfolgte eine 15-sekündige Zentrifugation der Proben bei 18 °C und 10 000 rpm. Daraufhin wurde der Durchfluss verworfen, und die RNeasy MinElute *Spin Column* wieder auf das 2 ml *collection tube* transferiert. Auf die Membran der RNeasy MinElute *Spin Columns* wurden dann jeweils 350 µl *Buffer RW1* gegeben und die Deckel geschlossen. Die Proben wurden erneut für 15 s bei 10 000 rpm und 18 °C zentrifugiert und der Durchfluss im Anschluss verworfen. Dies dient dazu unspezifisch an der Silikonmembran gebundene Moleküle, wie z. B. Fettsäuren, Proteine und Kohlenhydrate, von der Membran zu lösen, während die RNA in dieser belassen wird. Pro Probe wurde dann eine Mischung aus 10 µl DNase I *stock solution* und 70 µl *Buffer RDD* vorbereitet, indem beide Substanzen gut vermengt wurden. Diese wurde sodann genau auf die Membran der RNeasy MinElute *Spin Column* pipettiert und die Proben zwecks Abbaus von DNA-Resten und Sicherstellung der Bindung der RNA an die Membran für 15 min bei Raumtemperatur abgestellt. Nach Ablauf dieser Zeit wurden pro Probe erneut 350 µl *Buffer RW1* auf die *Spin Column* gegeben und die Proben bei 18 °C 15 s lang bei 10 000 rpm zentrifugiert. Durchfluss und *tube* wurden verworfen und die RNeasy MinElute *Spin Column* auf ein neues 2 ml *collection tube* platziert. Es wurden jeweils 500 µl *Buffer RPE* hinzugegeben und die *Spin Columns* verschlossen. Anschließend wurden die Proben wieder genau wie im letzten Schritt zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Daraufhin wurden je 500 µl 80 %iger Ethanol auf die Säulen pipettiert und die Proben bei geschlossenem Deckel für 2 min bei 18 °C und 10 720 x g zentrifugiert, um die membrangebundene RNA zu waschen. Durchfluss und *tube* wurden erneut verworfen, und die RNeasy MinElute *Spin Column* auf ein neues 2 ml *collection tube* transferiert. Bei offenem Deckel wurden die Proben bei 14 000 rpm und 18 °C für 5 min zentrifugiert, um die Membranen der RNeasy MinElute *Spin Columns* zu trocknen und von möglichen Ethanol-Überresten zu befreien. Im Anschluss wurden die *Spin Columns* auf neuen 1,5 ml *collection tubes* platziert, 17 µl Nuklease-freies Wasser direkt auf die Membran gegeben und die Proben für eine Minute bei 14 000 rpm und 18 °C zentrifugiert. Um die RNA-Konzentration möglichst zu

erhöhen, wurde dieser Vorgang ein zweites Mal wiederholt, indem die 17 µl Durchfluss erneut auf die Membran pipettiert und die Proben erneut auf gleiche Weise zentrifugiert wurden.

Die RNA-Konzentration wurde mittels spektrophotometrischer Quantifizierung unter Verwendung des Nanophotometers P330 (Implein) und Befolgung der Herstellerangaben ermittelt. Hinsichtlich der Nanophotometer-Einstellungen wurde entsprechend mit dem *Lid* 10, einem Verdünnungsfaktor von 1000, der Hintergrundkorrektur und einem Faktor 40 für die RNA gearbeitet. Zunächst wurde das Gerät mit einer Leerprobe aus 2 µl Nuklease-freiem Wasser geeicht. Anschließend wurden die zu messenden RNA-Proben jeweils gut durchmischt, je 2 µl der Lösung entnommen und die RNA-Konzentration der Proben nacheinander mit oben genannten Einstellungen ermittelt. Hierbei wurde die Küvette nach jeder erfolgten Messung gründlich gereinigt. Die RNA-Konzentration in ng/µl wurde für die Berechnung der benötigten Probenmenge notiert.

2.4.3.2 cDNA-Synthese

Die Synthese eines komplementären DNA-Stranges aus der isolierten RNA (cDNA-Synthese) erfolgte unter Verwendung des iScript gDNA *clear* cDNA *Synthesis Kit* (Bio-Rad Laboratories) nach Herstellerangaben. Um die Proben kühl zu halten, wurden diese während der gesamten Bearbeitung in einer Kühlplatte (PCR-cooler) gelagert. Um Unterschiede in den Zellzahlen und isolierter RNA auszugleichen, wurde jeweils die gleiche Menge an Gesamt-RNA verwendet. Es wurde je Probe eine Gesamtmenge von 192 ng RNA für die cDNA-Synthese verwendet. Aufgrund der geringen RNA-Konzentration wurde diese auf 2 Eppis verteilt und somit pro Eppi 96 ng RNA mit Nuklease-freiem Wasser auf 14 µl aufgefüllt. Anschließend wurde ein pro Reaktion aus 0,5 µl iScript DNase und 1,5 µl iScript DNase *Buffer* bestehender DNase *Mastermix* angefertigt. Dieser dient dazu die genomische DNA (gDNA), welche bei der späteren RT-PCR miterfasst werden könnte, unter Erhalt der RNA zu beseitigen. Je Probe wurden 2 µl *Mastermix* hinzugegeben und durch Pulszentrifugieren in der Mini-Zentrifuge eine Vermengung mit der verdünnten RNA erreicht. Im Anschluss wurde unter Verwendung des PeqSTAR 96X *Thermocyclers* (Peqlab) das DNase Reaktionsprotokoll durchgeführt. Hierbei wurden die Proben zunächst für den enzymatischen Verdau der gDNA 5 min bei 25 °C und dann zwecks Reaktionsstopps weitere 5 min bei 75 °C inkubiert. Die Proben wurden sodann auf 4 °C abgekühlt und kurz zentrifugiert.

Für die cDNA-Synthese-Reaktion wurden pro Eppi 4 µl iScript *Reverse Transcription Supermix* hinzugefügt, um ein Gesamtvolumen von 20 µl zu erreichen. Zur Vermis-

sung wurden die Eppis mehrmals invertiert und daraufhin in der Mini-Zentrifuge puls-zentrifugiert. Im Anschluss wurde das cDNA-Synthese Protokoll nach Herstelleranga-ben durchgeführt. Hierzu wurden die Proben im *Thermocycler* platziert und zunächst für 5 min bei 25 °C inkubiert, um eine Bindung der im *iScript Reverse Transcription Su-permix* enthaltenen Primer – einer Mischung aus Oligo-dT-Nukleotiden und *random* Nukleotiden – an die komplementären Enden der RNA zu ermöglichen. Für die Aktivie-rung der Reversen Transkriptase und den Ablauf der Reverse Transkriptase-Poly-merase-Kettenreaktion wurden die Proben dann weitere 30 min bei 46 °C inkubiert. Zu-letzt wurde das Enzym durch eine einminütige Inkubation bei 95 °C inaktiviert und die Proben schließlich auf 4 °C abgekühlt. Die Proben wurden in der Mini-Zentrifuge puls-zentrifugiert und jeweils mit Nuklease-freiem Wasser auf 40 µl aufgefüllt. Zwei gleiche Proben wurden zusammengefügt, sodass eine 80 µl Probe mit entstand. Die entstan-dene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung für die quantitative RT-PCR bei -20 °C gelagert.

2.4.4 Farbstoffbasierte quantitative real time PCR

2.4.4.1 Prinzip

Bei der PCR handelt es sich um ein Verfahren, das der selektiven Vervielfältigung von DNA-Sequenzen dient. Durch spezifische Oligonukleotide, sogenannte Primer, die an ihre komplementären DNA-Abschnitte binden, werden die Enden der gewünschten Se-quenzen markiert, um im Anschluss von einer DNA-Polymerase amplifiziert zu werden. Hierbei werden mehrere Zyklen durchlaufen, wodurch auch kleinste Probenmengen vervielfältigt werden können. Ein Zyklus besteht hierbei generell aus 3 Reaktionsschrit-ten. In der Denaturierungsphase (bei 95 °C) werden zunächst DNA-Doppelstränge in Einzelstränge aufgetrennt. Es folgt dann die Anlagerung der Primer an die entspre-chenden DNA-Abschnitte (*Annealing*). Im letzten Schritt wird die markierte Sequenz durch die DNA-Polymerase von den Primern ausgehend synthetisiert (*Extension*), so-dass für den nächsten Zyklus die doppelte Menge dieses DNA-Abschnitts zur Verfü-gung steht. Durch Zugabe eines fluoreszierenden Farbstoffs (in diesem Fall SyGreen), dessen Fluoreszenz bei Bindung an doppelsträngige DNA (dsDNA) zunimmt, kann durch die Messung dieser Fluoreszenz in Echtzeit ein Rückschluss auf die vorhandene Menge an dsDNA, und damit auf die ursprünglich vorhandene Menge mRNA (*messen-ger RNA*) gezogen werden.

2.4.4.2 Durchführung

Die hier beschriebene PCR wurde unter Verwendung des qPCRBIO SyGreen Mix Hi-ROX (PCR Biosystems) nach Herstellerangaben durchgeführt. Aufgrund der hierin ent-

haltenen „hot start“ Polymerase, welche erst bei 95 °C aktiviert wird, konnte der Versuch bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Die verwendeten Primer wurden von Frau Katharina Krebber entworfen und bei Eurofins oder TIB Molbiol geordert (s. Materialliste). Es wurde zunächst ein *Mastermix* aus Nuklease-freiem Wasser, Sygreen Mix und den jeweiligen verwendeten Primern erstellt, gut vermischt und in die PCR-Platte überführt. Im letzten Schritt wurde die cDNA der verschiedenen Proben hinzugegeben. Es wurden in jeder PCR-Platte jeweils drei Proben von SLE-Patienten und drei Proben von gesunden Probanden gleichzeitig per Doppelbestimmung untersucht. Für die *negative template* Kontrolle wurden 3 µl RNase-freies Wasser hinzugegeben und für die Referenz 3 µl Referenz-DNA verwendet. Das Ansatzvolumen betrug immer 20 µl und setzte sich zusammen aus 5,8 µl nukleasefreiem Wasser, 10 µl Sygreen Mix, 0,6 µl *forward primer*, 0,6 µl *reverse primer* und 3 µl cDNA. Die fertige PCR-Platte wurde im Anschluss mit einer PCR-Folie unter Verwendung eines Applikators beklebt, um ein Verdunsten der Proben bei höheren Temperaturen zu vermeiden und einmalig bei 1000 rpm zentrifugiert. In Anschluss wurde die Platte vorsichtig im SteponePlus *Real-Time* PCR-System (Thermo Fisher Scientific) platziert. Hierbei wurde folgende Programmierung verwendet:

Programm	Zyklen	Temperatur	Dauer
Aktivierung der „hot-start“ Polymerase	1	95 °C	2 min
Denaturierung	40	95 °C	5 s
<i>Annealing/Extension</i>		60-65 °C (je nach Primer)	30 s

Tabelle 8: Übersicht der Programmierung des PCR-Systems

Die Hybridisierungstemperatur wurde an die jeweils verwendeten Primer (s. Materialliste) angepasst.

2.4.4.3 Auswertung

Zunächst erfolgte nach 40 PCR-Zyklen die qualitative Auswertung mittels Schmelzkurvenanalyse. Hierbei werden entstehende Primerdimere von der eigentlichen DNA der Zielgene unterschieden. Primerdimere können durch unspezifische Anlagerung der komplementären *forward* und *reverse* Primer als Nebenprodukt bei der RT-PCR entstehen und aufgrund des unspezifisch bindenden Farbstoffes SyGreen bei der Auswertung miterfasst werden. Da sie jedoch aus kürzeren Basensequenzen bestehen, als die eigentlichen Zielprodukte, denaturieren sie bei deutlich niedrigeren Temperaturen und können so anhand der Schmelzkurvenanalyse eindeutig unterschieden werden. Eine Auswertung der Werte für IFN α 1 war nicht möglich, da nach den 40 Zyklen kein Produkt messbar war. Die weitere Verwendung der Primer für IFN α 1 wurde aus diesem

Grund im Verlauf abgebrochen. Für die quantitative Auswertung wurde die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode verwendet. Der Ct-Wert (*cycle threshold*) gibt an wie viele PCR-Zyklen notwendig sind, damit die Fluoreszenz einen anhand der Hintergrundfluoreszenz gesetzten Grenzwert überschreitet und korreliert damit bei konstanten Bedingungen mit der in der Probe vorhandenen Ausgangs-RNA. Zur Berechnung wurde der jeweilige Mittelwert der Ct-Werte aus den Doppelbestimmungen verwendet. Für die relative Quantifizierung mittels $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode wurden die jeweiligen Ct-Werte in Relation zum Ct-Wert des verwendeten Referenzgens mit stabiler Genexpression (*housekeeping* Gen) gesetzt. In unserem Versuch verwendeten wir hierfür $\beta 2$ -Mikroglobulin (B2M). Von den auf diese Weise erhaltenen ΔCt -Werten wurde der Mittelwert aus den gesunden Proben erstellt und die Differenz der einzelnen ΔCt -Werte hierzu berechnet, um somit den $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert zu erhalten. Um die n-fache Expression der mRNA zu berechnen, wurde die gängige Formel $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ verwendet.

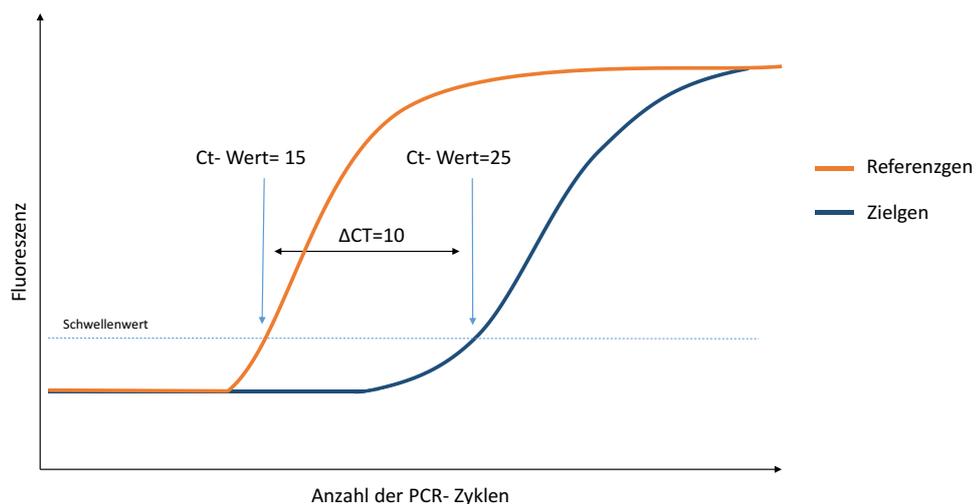


Abb. 4: Beispielhafte schematische Darstellung der ΔCt -Methode

In diesem Beispiel beträgt der Ct-Wert des Zielgens (orange), also die Anzahl der Zyklen die für die Überschreitung des Schwellenwertes nötig ist, 25 und der Ct-Wert des Referenzgens (blau) 15. Der für die weitere Berechnung notwendige ΔCt -Wert beträgt somit 10. Ct = *cycle threshold*, PCR = *polymerase chain reaction*.

Die statistische Auswertung und das Erstellen von Graphiken erfolgten mit GraphPad Prism 9. Für die Berechnung der p-Werte wurde ein Mann-Whitney U Test verwendet. Alle p-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

2.5 Suppressionsassays

2.5.1 Prinzip

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die die Etablierung einer Methode zur Untersuchung B-Zell-vermittelter supprimierender Effekte auf die T-Zell-Proliferation. Hierfür wurden CD19+ B-Zellen isoliert und in Co-Kulturen mit PBMC die Proliferation von CD4+ und CD8+ T-Zellen bei unterschiedlichen Verhältnissen, unter Hinzugabe von Stimulantien, sowie unter Hinzugabe von A3R-Agonisten und -Antagonisten gemessen.

2.5.2 B-Zell Isolierung

Für die Etablierung der Suppressionsassays wurde mit Proben von 13 SLE-Patienten und 7 *Buffy coats* von gesunden Probanden gearbeitet.

Die zuvor isolierten PBMCs (s. 2.3) wurden auf gleiche Weise wie für die Pan B-Zell Isolierung (s. 2.4.1) vorsichtig aufgetaut und die Gesamtzellzahl mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Da im Pan B-Zell *isolation Kit* (Miltenyi Biotec) Antikörper gegen CD4 vorhanden sind, wodurch die Anfärbung der CD4+ T-Zellen im späteren Verlauf des Versuchs behindert worden wäre, wurden in diesem Fall CD19+ B-Zellen isoliert.

Die Isolation der CD19+ B-Zellen erfolgte unter Benutzung der CD19 *MicroBeads* (Miltenyi Biotec) nach Herstellerangaben mittels MACS. Hierzu wurde zunächst die 10 ml Zellsuspension mit den PBMCs für 10 min bei 8 °C und 300 x g erneut zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde anschließend entsprechend der jeweiligen Zellzahl in 80 µl kaltem *Running Buffer* pro 10⁷ Zellen resuspendiert. Zu je 10⁷ Zellen wurden 20 µl CD19 *Microbeads* hinzugegeben, die Probe im Anschluss gevortext und für 5 min im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Es folgte eine Hinzugabe von 1-2 ml *Running Buffer* pro 10⁷ Zellen mit anschließender Zentrifugation für 10 min bei 8 °C und 300 x g. Analog zum Vorgehen der Pan B-Zell-Isolierung (s. 2.4.1) erfolgte nun die magnetische Zellseparation. Hierbei entsprach der Durchfluss den Rest-PBMCs. Hier erfolgte das Auffüllen mit RPMI und die Zellen wurden zeitweise im Kühlschrank gelagert. Die CD19+ B-Zellen wurden aus der Säule in ein 15 ml *tube* gedrückt. Im Anschluss wurden 10 µl aus der Zellsuspension entnommen und es erfolgte die Zellzählung der lebenden Zellen mittels Durchflusszytometrie (s. Abschnitt 2.4.2) unter Hinzugabe von Propidiumiodidlösung (Miltenyi Biotec). Bei Propidiumiodid handelt es sich um einen fluoreszierenden Nukleinsäureninterkalator, der nur die Membran von toten Zellen passieren kann, und somit für die bei der Auswertung relevante Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen wichtig ist. Die restliche Zellsuspension wurde mit RPMI auf 10 ml aufgefüllt und anschließend bei 4 °C für 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Daraufhin erfolgte die Resuspension in 2 ml RPMI.

2.5.3 Stimulation der B-Zellen

Zur Stimulation der B-Zellen wurde CpG ODN 2006 (Invivogen) verwendet. Hierbei handelt es sich um Oligonukleotide aus Guanin und Cytosin, welche als humane TLR9-Liganden an B-Zellen fungieren, und diese damit aktivieren. Von den zuvor bei -20 °C gelagerten CpG Aliquots mit einer Konzentration von 3,85 mg/ml wurde zur Stimulation eine CpG-Konzentration von 2,5 µg/ml verwendet. Für die Stimulierung wurde eine 24 well Kulturplatte verwendet. In alle verwendeten wells wurde zunächst 1 ml RPMI hineingegeben. Daraus wurden im Anschluss 1,3 µl wieder herausgenommen und mit 1,3 µl CpG-Lösung für die Stimulation oder mit 1,3 µl endotoxinfreiem Wasser für die Kontrollgruppe ersetzt. Bei beiden Bedingungen sollte nun die Wirkung von einem A3R-Agonisten und einem A3R-Antagonisten getestet werden. Als A3R-Agonist wurde *1-[2-Chloro-6-[[3-iodophenyl)methyl]amino]-9H-purin-9-yl]-1-deoxy-N-methyl-β-D-ribofuranonamide* (2-Cl-IB-MECA von Tocris) in verschiedenen Konzentrationen (50 nM, 100 nM und 200 nM) verwendet. Als A3R-Antagonist wurde *(8R)-8-Ethyl-1,4,7,8-tetrahydro-4-methyl-2-(2,3,5-trichlorophenyl)-5H-imidazo[2,1-i]purin-5-one monohydrochloride* (PSB 10 hydrochloride von Tocris) ebenfalls in verschiedenen Konzentrationen (50 nM, 100 nM und 200 nM) verwendet. Es wurden jeweils 5 µl, 10 µl oder 20 µl der Substanzen aus der zuvor erstellten Vorverdünnung in die mit RPMI (mit oder ohne CpG) gefüllten wells pipettiert, um die gewünschten Konzentrationen zu erreichen. Die Zellsuspension wurde nach Anzahl der Bedingungen mit RPMI aufgefüllt, jeweils 1 ml der Zellsuspension zu den gefüllten wells gegeben und mit der Pipette gut durchmischt. Aufgrund der geringen Zellzahl bei den Proben der SLE-Patienten, konnten nicht alle Bedingungen bei jedem Versuch untersucht werden. Die leeren wells wurden mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (DPBS = *Dulbecco's Balanced Salt Solution*) aufgefüllt und die Platte wurde für 4 Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellsuspensionen gut durchmischt und jeweils auf 2 ml tubes verteilt. Um die Stimulantien herauszuwaschen folgte daraufhin das zweimalige Zentrifugieren bei 300 x g für 10 min bei 8 °C und Auffüllen mit RPMI je nach Zellzahl.

2.5.4 T-Zell Markierung und erste Messung

Während der Inkubationszeit der B-Zellen wurden die restlichen PBMCs mit *Cell Proliferation Dye eFluor 450* (Invitrogen) und die T-Zellen jeweils mit Antikörpern gegen CD4 und CD8 markiert, sowie die Messung zum Zeitpunkt null (t0) durchgeführt. Beim *Cell Proliferation Dye eFluor 450* handelt es sich um einen violett fluoreszierenden Farbstoff, welcher an einem Großteil der zellulären Proteine bindet und sich bei der Zellteilung gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt. Bei jeder Zellteilung halbiert sich

die Fluoreszenz, wodurch über deren Messung eine Beurteilung der Zellproliferation möglich ist (s. Abb. 5)

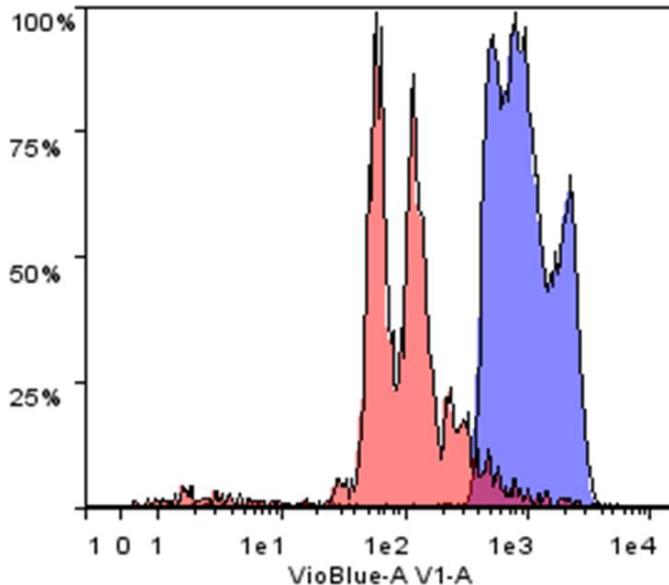


Abb. 5: Beispielhafte Darstellung der Proliferation von T-Zellen eines SLE-Patienten

Verhalten der Fluoreszenz der T-Zellen unter Anfärbung mit *Cell Proliferation Dye eFluor 450* zum Zeitpunkt null (blau) und nach 72 Stunden (rot). X-Achse: Fluoreszenz im VioBlue-Kanal, Y-Achse: *Cell-events* in %

Da für das Anfärben mit *Cell Proliferation Dye eFluor 450* eine maximale Zellkonzentration von 2×10^7 Zellen nicht überschritten werden sollte, wurde zunächst eine Zellzählung der Rest-PBMCs mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Im Anschluss erfolgte ein einmaliges Zentrifugieren bei $300 \times g$ und $4^\circ C$ für 10 min und ein Auffüllen mit bei $37^\circ C$ vorgewärmtem DPBS. Es folgte das zweimalige Waschen mittels Zentrifugieren und Resuspendieren der Zellen in 1 ml warmem DPBS bei $300 \times g$ und $18^\circ C$ für jeweils 10 min. Für das Anfärben wurde 1 ml einer $20 \mu M$ Lösung des *Cell Proliferation Dye eFluor 450* vorbereitet und gut mit der Zellsuspension vermischt, um eine Gesamtkonzentration von $10 \mu M$ zu erreichen. Die Zellen wurden anschließend für 10 min bei $37^\circ C$ im Dunkeln inkubiert. Daraufhin füllten wir die Lösung mit 15 ml gekühltem RPMI auf und inkubierten das Gemisch für 5 min im Dunkeln auf Eis, um die Reaktion zu stoppen. Es erfolgte im Anschluss die 3-malige Zentrifugation bei $300 \times g$ und $4^\circ C$ für 10 min mit jeweils anschließender Resuspension der Zellen in RPMI. Daraufhin folgte eine Zellzählung der *viable cells* unter Hinzugabe von Propidiumiodid mittels FACS. Zum Schluss resuspendierten wir die Zellen entsprechend der Zellzahl in RPMI ($100\,000$ Zellen pro $10 \mu l$ RPMI).

Es wurden jeweils 100 000 Zellen (in 100 µl) für die Messung zum Zeitpunkt null in ein *well* einer 96-*well Suspension Culture Plate* überführt. Die Platte wurde bei 300 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, die Überstände abgesaugt und die Zellen im Anschluss in 20 µl der Mischung von FcR *Blocking Reagent* mit MACS Quant *Running Buffer* (s. 2.4.1) resuspendiert. Es folgte die Inkubation bei 4 °C für 10 min. Die fluoreszierenden Antikörper für CD4 und CD8 und ihre jeweiligen Isotypkontrollen (s. Materialliste) wurden in einer 1:50 Verdünnung hinzugegeben, mittels Pipettieren gut vermengt und das Gemisch erneut bei 4 °C für 10 min inkubiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension auf 200 µl mit MACS Quant *Running Buffer* aufgefüllt, die Platte erneut bei 300 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und die Zellen mit 200 µl MACS Quant *Running Buffer* resuspendiert. Es folgte sodann die durchflusszytometrische Messung mit dem MACS Quant *Analyzer 10* bei Raumtemperatur zum Zeitpunkt t0.

2.5.5 Befüllung der Inkubationsplatten, T-Zell Aktivierung und abschließende Messung

Die für 4 Stunden mit den verschiedenen Stimulantien behandelten B-Zellen (s. 2.5.3) wurden mit verschiedenen Verhältnissen nun erneut mit den restlichen PBMCs vermengt. Hierbei wurden Verhältnisse von B-Zellen zu PBMCs von 1:1 und 10:1 untersucht. Zudem erfolgte auch die Betrachtung von T-Zellen ohne Hinzugabe der B-Zellen. Die Zellsuspensionen wurden entsprechend der jeweiligen Bedingungen mit einem Gesamtvolumen von 200 µl in die *wells* einer 96-*well Suspension Culture Plate* überführt.

Zur Aktivierung der T-Zellen wurden CD3 *Monoclonal Antibody* (HIT3a) und CD28 *Monoclonal Antibody* (CD28.2) von Invitrogen verwendet. Dies ist notwendig, um unter *in vitro* Voraussetzungen eine Proliferation der T-Zellen zu gewährleisten. Der monoklonale Antikörper gegen CD3 führt hierbei über eine Quervernetzung mit dem T-Zell Rezeptor zu einer Aktivierung und verstärkten Proliferation der T-Zellen. Der monoklonale Antikörper gegen CD28 führt durch Bindung an CD80 und CD86 zu einer starken Co-Stimulation von T-Zellen. Beide Antikörper wurden in einer Gesamtkonzentration von 1 µg/ml verwendet, mit einer Gesamtmenge an vorverdünnter Lösung von 5 µl zu den jeweiligen *wells* gegeben und alles gut vermengt. Einige *wells* wurden als Negativkontrollen entsprechend ausgelassen und diese Zellen nicht mit CD3- und CD28-Antikörpern aktiviert. Alle leeren *wells* wurden mit gleicher Menge an DPBS aufgefüllt und die Platte in den Brutschrank gestellt und für 72 Stunden inkubiert.

Nach 72 Stunden wurde die Platte bei 300 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, die Überstände abgenommen und für eventuelle weitere zukünftige Versuche eingefroren.

Es folgte die Markierung der T-Zellen mit den fluoreszierenden Antikörpern gegen CD4 und CD8 mit anschließendem FACS analog zum Vorgehen beim Zeitpunkt 0 (s. 2.5.4). Aufgrund der Komplexität des Versuchsaufbaus, ist dieser im Folgenden in Abb. 6 zusammenfassend schematisch dargestellt.

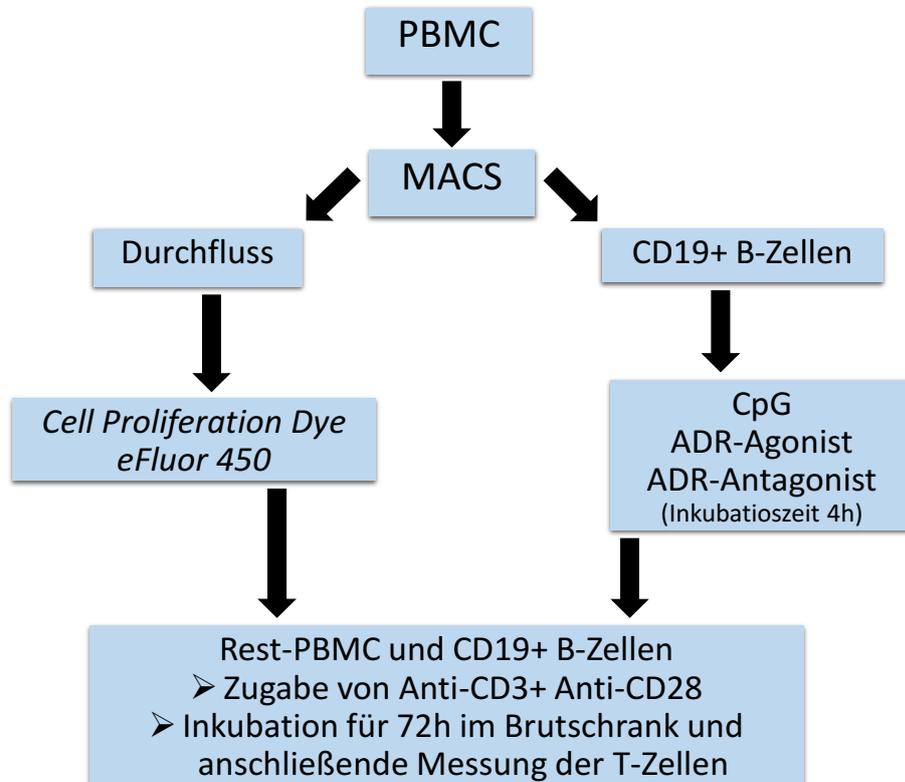


Abb. 6: Zusammenfassende schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der Suppressionsassays
 PBMC = *peripheral blood mononuclear cells*, MACS = *magnetic cell sorting*, ADR = Adenosinrezeptor, CD = *cluster of differentiation*, h = Stunden.

2.5.6 Etablierung und Auswertung

Zur Etablierung der Methodik wurden zunächst verschiedene Bedingungen und Inkubationszeiten untersucht. Zunächst wurde das Verhalten der Zellen ohne Hinzugabe des A3R-Agonisten und -Antagonisten anhand aufgetauter Proben untersucht. Hier konnte eine Zellproliferation festgestellt werden und es wurde eine Inkubationszeit von 72 Stunden gewählt. Um zu untersuchen, ob der Prozess des Einfrierens das Verhalten der Zellen verändert, wurden die Proben eines SLE-Patienten und eines gesunden Probanden auch in frischem Zustand untersucht. Aufgrund der hohen Zellzahl bei der Probe des gesunden Probanden, konnte hier die Hälfte der Zellen eingefroren werden und die andere Zelle in frischem Zustand untersucht werden. Hier zeigte sich zwar eine insgesamt bessere Proliferation bei frischen Zellen, das Verhalten nach Hinzugabe der Stimulantien änderte sich jedoch nicht. Aufgrund des sehr hohen Zeitaufwandes und

der Möglichkeit mehrere Proben gleichzeitig zu untersuchen, wurde daher als Vorgehen die Betrachtung eingefrorener Zellen gewählt. Zudem wurden der A3R-Agonist und der A3R-Antagonist erst nach Feststellung eines funktionsfähigen Modells hinzugegeben. Die Probe eines SLE-Patienten musste aufgrund der geringen Zellzahl verworfen werden und konnte nicht untersucht werden. Für die Vorversuche wurden insgesamt Proben von 5 SLE-Patienten und 3 gesunden Probanden verwendet.

In der abschließenden Auswertung wurden nur diejenigen Versuche betrachtet, die unter gleichen Bedingungen mit Untersuchung der A3R-Agonisten und -Antagonisten durchgeführt wurden und bei denen eine Inkubationszeit von 72 Stunden eingehalten wurde. Aufgrund von Zelltod in einigen Versuchen mussten die Proben von 3 SLE-Patienten aus der Gesamtauswertung herausgenommen werden. Die Gesamtauswertung beinhaltet somit die Proben von 7 SLE-Patienten und 4 gesunden Probanden.

Die durchflusszytometrischen Daten wurden mit der Software Flowlogic (Version MACS Miltenyi Biotec) ausgewertet. Für die Auswertung wurde zum einen die mittlere Fluoreszenz (MFI = *mean fluorescence intensity*) betrachtet. Hierbei ergab sich die Problematik, dass es je nach Probe, möglicherweise aufgrund der Zellzahl oder des Verhaltens der Zellen, zu sehr unterschiedlichen Ausgangswerten kam, sodass wir uns, um vergleichbare Werte zu erhalten, dazu entschlossen für die Auswertung die Werte der MFI nach 72 Stunden in Relation zur MFI zum Zeitpunkt null zu verwenden. Als zweiter Ansatz wurde für die Auswertung der prozentuale Anteil an Zellen betrachtet, welche über den Zeitpunkt t_0 hinaus proliferieren. Die Gating-Strategie, die bei der Auswertung verwendet wurde, ist in Abb. 7 aufgeführt.

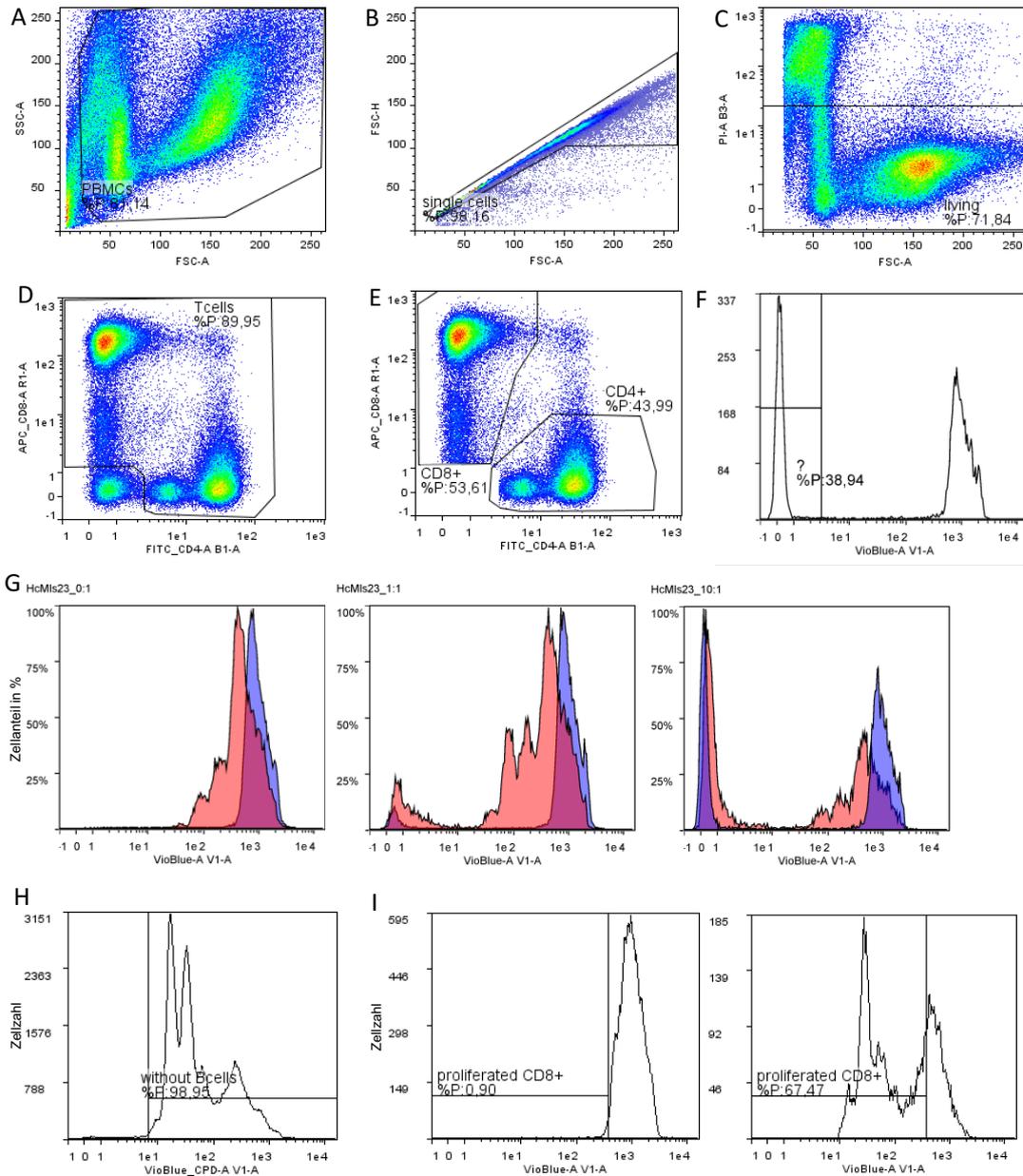


Abb. 7: Gatingstrategie für die Suppressionsassays. Darstellung mittels Flowlogic

- (A) Punktplot mit Darstellung des Gatings der PBMCs. Herausgaten von Zellfragmenten (s. Abb.1)
- (B) Punktplot zur Betrachtung nur der *single cells* (s. Abb.1).
- (C) Punktplot zur Darstellung des Gatings der *living cells* anhand von Propidiumiodid (Y-Achse). Zellpopulationen mit vermehrter Propidiumiodidanreicherung werden als tote Zellen nicht in der Auswertung betrachtet.
- (D) Punktplot zur Darstellung des Gates für die T-Zellen. Gate-Setzung anhand der Zellpopulationen und Isotypkontrollen für CD4 und CD8 zum jeweiligen Zeitpunkt.
- (E) Zusätzliches Gate zur Betrachtung der T-Zell-Untergruppen anhand der Populationen im Punktplot.
- (F) Histogramm zur Darstellung eines *peaks* an nicht mit *Cell Proliferation Dye eFluor 450* angefärbten Zellen (hier mit „?“ benannt), welcher sich in allen Proben mit hinzugegebenen B-Zellen, sowohl zum Zeitpunkt t0, als auch nach 72 Stunden zeigte.
- (G) Verhalten des „?“-peaks in Histogrammen in Abhängigkeit des Verhältnisses von B- und T-Zellen am Beispiel der Probe eines gesunden Probanden (HcMIs23). Hier zeigt sich eine deutliche positive Korrelation mit der Anzahl an hinzugegebenen B-Zellen. Blau dargestellt ist die Proliferation zum Zeitpunkt t0

und rot dargestellt die zum Zeitpunkt t72. Hierbei könnte es sich möglicherweise, aufgrund einer nicht ganz reinen B-Zell-Isolierung, um nicht angefärbte T-Zellen handeln, oder um B-Zellen, die fälschlicherweise in das T-Zell-Gate strahlen. Da diese Zellen bereits zum Zeitpunkt t0 nicht mit *Cell Proliferation Dye eFluor 450* angefärbt waren, wurden sie in der Auswertung nicht betrachtet.

(H) Histogramm zur beispielhaften Darstellung des „without Bcells“ gate, welches für die Auswertung verwendet wurde. Anhand dieses Gates wurde die MFI zum Zeitpunkt t72 mit der MFI zum Zeitpunkt t0 verglichen.

(I) Beispielhafte Darstellung der Gate-Setzung für den Anteil an proliferierter CD8+ T-Zellen (in % zur Gesamtzellzahl). Die Schwelle wird anhand der Fluoreszenz zum Zeitpunkt null (Histogramm links) mit einer Toleranz von < 1 % an nicht proliferierten Zellen gesetzt. Alle Zellen mit einer Fluoreszenz unterhalb dieses Schwellenwertes werden nach 72 Stunden als proliferierte Zellen ausgewertet.

(CD = *cluster of differentiation*)

Die statistische Auswertung erfolgte über ein mit der Software R erstelltes lineares Regressionsmodell über die lme-Funktion des Programms. Als allgemeine Gleichung für das Modell verwendeten wir den jeweils zu untersuchenden Wert (relative MFI oder prozentuale Proliferation) als abhängige Variable in Abhängigkeit von der Diagnose und Agonisten- bzw. Antagonistenkonzentration mit der Probennummer als *random effect*. Eine beispielhafte Gleichung stellte sich so dar:

$$\text{Relative MFI} \sim \text{Agonistenkonzentration} * \text{Diagnose}, \text{ random} = \sim 1 \mid \text{Probe.ID}$$

Die dargestellten Graphiken wurden mit *GraphPad Prism 9* erstellt.

2.6 Ethik

Der Studienplan wurde der zuständigen Ethikkommission vorgelegt und von dieser bewilligt (Interne Studien-Nr. 5714R). Die Untersuchungen erfolgten in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki. Alle Patienten wurden vor der Studienteilnahme ausführlich aufgeklärt und gaben Ihre Einwilligung. Durch Kodierung der Blutproben mittels einer Patienten-ID wurden Patientendaten pseudonymisiert. Ein Rückschluss auf die Identität der Probanden war durch das Laborpersonal nicht möglich. Eine Rücknahme der Einwilligung an der Studienteilnahme war von Seiten der Patienten jederzeit ohne Rechtfertigung möglich.

3 Resultate

3.1 Resultate der B-Zell-Analyse

3.1.1 Regulatorische B-Zellen bei SLE-Patienten vermindert

Im Mittel zeigten sich in der FACS-Analyse bei den gesunden Probanden 45 596 Gesamt-B-Zellen und bei den SLE-Patienten 44 487 B-Zellen ($p = 0,7689$), 95 % KI [-8706, +6469]. In der absoluten Anzahl der betrachteten B-Zellen ergaben sich demnach keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Gesunden und SLE-Patienten.

Bei der Auswertung der in der Literatur beschriebenen CD19+CD5+ und CD19+CD5+CD1d+ B_{reg}-Populationen, sowie der CD19+CD5+CD1d+CD11c+ B-Zell-Population zeigten sich unter Durchführung eines Mann-Whitney U Tests Unterschiede zwischen SLE-Patienten und gesunden Probanden. Der Anteil CD19+CD5+ B-Zellen an der gesamten B-Zell Population zeigte sich bei SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden deutlich vermindert ($p < 0,0001$), 95 % KI [-7,837, -3,444] mit einem Mittelwert von 9,43 % bei Gesunden und 3,85 % bei SLE-Patienten. Auch die Untersuchung der CD19+CD5+CD1d+ B-Zell-Gruppe ($p = 0,0080$), 95 % KI [-1,573, -0,2702] ergab einen statistisch signifikanten Unterschied bei Mittelwerten von 2,76 % bei Gesunden und 1,68 % bei SLE-Patienten, der sich auch unter Hinzunahme von CD11c in die Auswertung weiterhin nachweisen ließ ($p = 0,0155$), 95 % KI [-0,8640, -0,1088] (s. Abb.8).

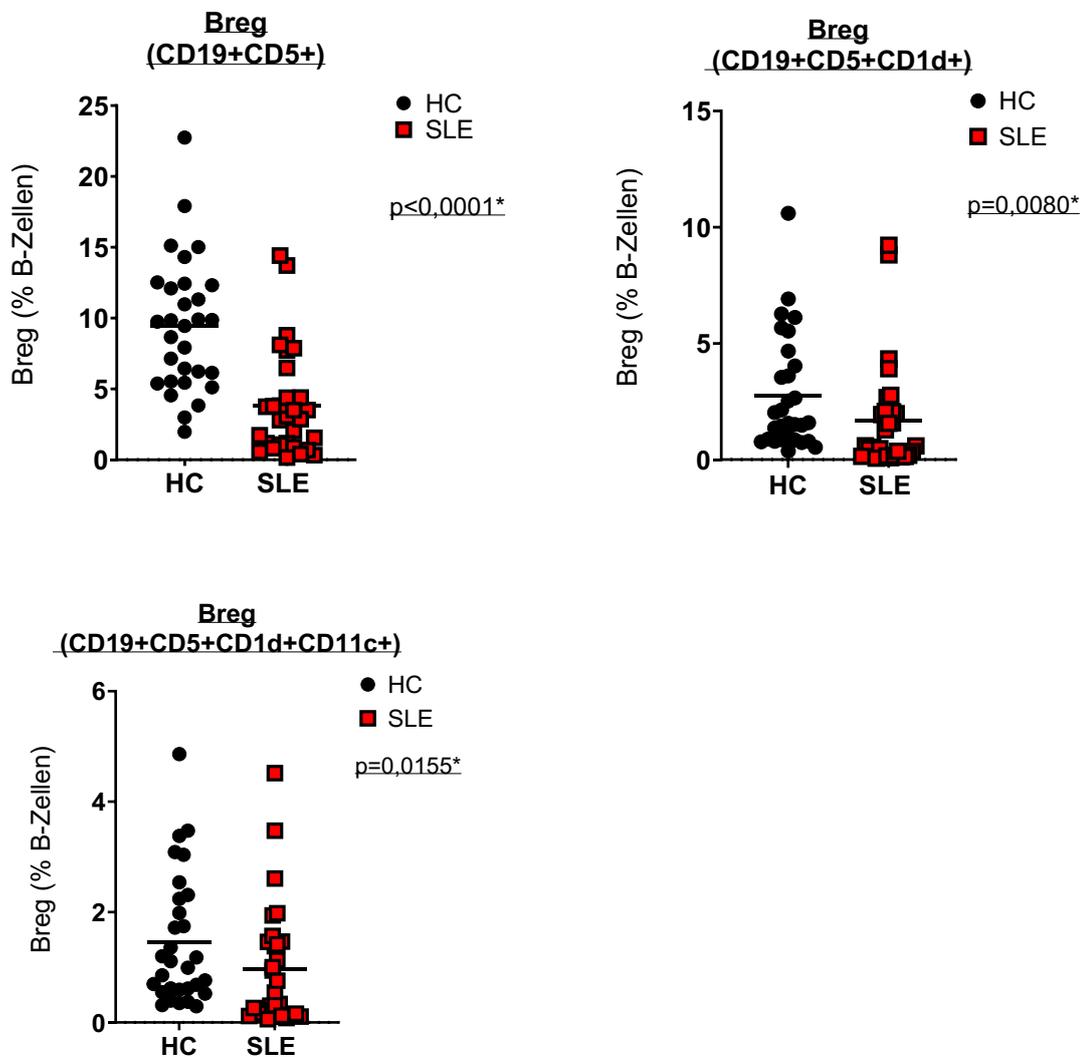


Abb. 8: Unterschiede regulatorischer B-Zellen von SLE-Patienten und gesunden Probanden unter zusätzlicher Betrachtung von CD11c

Mittels Durchflusszytometrie untersuchter Anteil in der Literatur beschriebener regulatorischer B-Zellen an Gesamt-B-Zellen (in %) im Vergleich zwischen gesunden Probanden (*healthy controls* = HC) und SLE-Patienten (SLE). Darstellung als Punktdiagramm, wobei ein Punkt einem Probanden entspricht. Mittelwerte werden mittels der horizontalen Linie veranschaulicht. Die p-Werte wurden mittels Mann-Whitney U Test berechnet. $p < 0,05$ wird als statistisch signifikant (*) gewertet. CD = *cluster of differentiation*, B_{reg} = regulatorische B-Zellen.

Bei der Untersuchung der zu Beginn der Arbeit anhand von Oberflächenmarkern definierten Population an regulatorischen B-Zellen zeigten sich unter Durchführung eines Mann-Whitney U Tests leichte Unterschiede zwischen SLE-Patienten und gesunden Probanden. In der CD19+IgM+CD24+CD23-CD1d+CD5+ B-Zell-Gruppe zeigte sich bei SLE-Patienten eine im Vergleich zu gesunden Probanden verminderte Zellzahl ($p = 0,0162$), 95 % KI [-0,5402, -0,0384] bei Mittelwerten von 1,14 % bei Gesunden und 0,71 % bei Erkrankten. Auch bei Betrachtung der CD19+IgM+CD24+CD23-CD1d+CD5+CD11c+ B-Zell-Gruppe ($p = 0,0296$), 95 % KI [-0, 2612, -0,0156] konnte ein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (s. Abb.8).

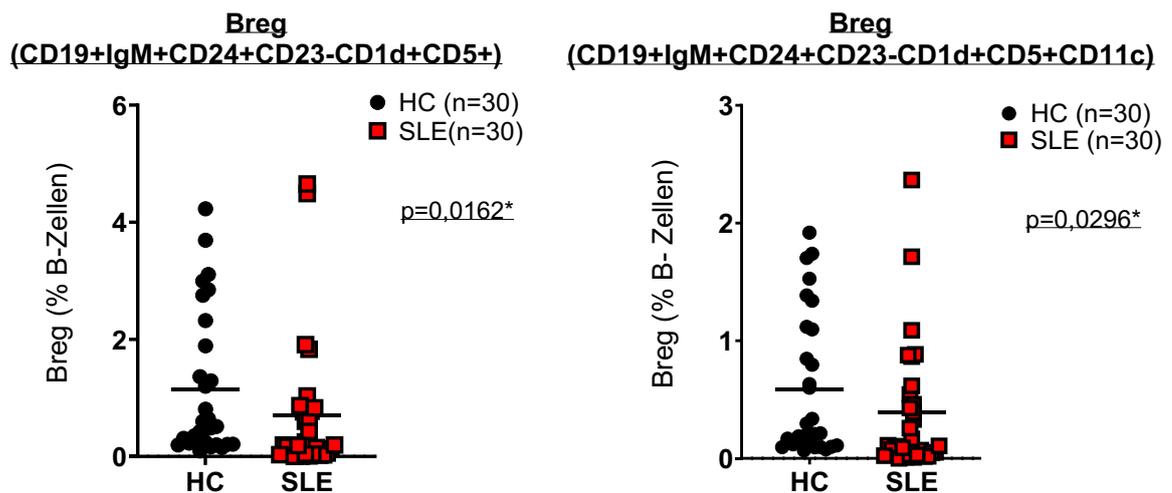


Abb. 9: Unterschiede der in dieser Arbeit neu definierten Gruppe regulatorischer B-Zellen von SLE-Patienten und gesunden Probanden unter zusätzlicher Betrachtung von CD11c

Mittels Durchflusszytometrie untersuchter Anteil der in dieser Arbeit neu definierten Population regulatorischer B-Zellen an Gesamt-B-Zellen (in %) im Vergleich zwischen gesunden Probanden (*healthy controls* = HC) und SLE-Patienten (SLE). Darstellung als Punktdiagramm, wobei ein Punkt einem Probanden entspricht. Mittelwerte werden mittels der horizontalen Linie veranschaulicht. Die p-Werte wurden mittels Mann-Whitney U Test berechnet. $p < 0,05$ wird als statistisch signifikant (*) gewertet. CD = *cluster of differentiation*, B_{reg} = regulatorische B- Zellen.

Wir betrachteten zudem den prozentualen Anteil der B_{reg}, der zusätzlich CD11c als Oberflächenmolekül exprimiert. Hier zeigte sich interessanterweise in beiden untersuchten Populationen bei SLE-Patienten, trotz geringerer Gesamtzellzahl, ein höherer Anteil CD11c+ B_{reg}, als bei gesunden Probanden (s. Abb.9). Dieser Unterschied war bei den CD19+CD5+CD1d+ B_{reg} statistisch signifikant ($p = 0,0027$), 95 % KI [4,41, 23,79] bei einem Mittelwert von 57,74 % bei Gesunden und 72,15 % bei SLE-Patienten, während sich bei den CD19+IgM+CD24+CD23-CD1d+CD5+ B_{reg}, bei einem Mittelwert von 53,07 % bei Gesunden und 61,09 % bei SLE-Patienten, ein statistischer Trend zeigte ($p = 0,0906$), 95 % KI [-0,77, 15,27].

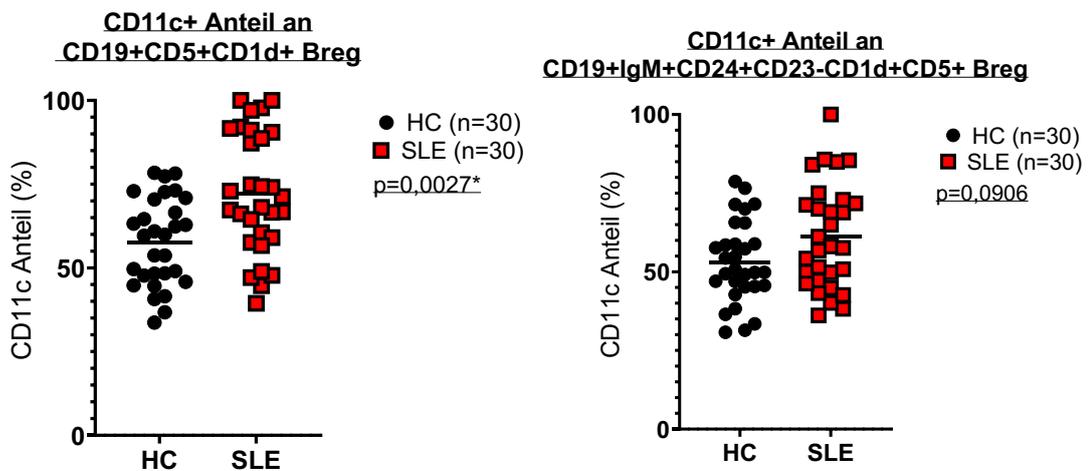


Abb. 10: Unterschiede im Anteil CD11c+ regulatorischer B-Zellen (in %) im Vergleich zwischen SLE-Patienten und gesunden Probanden

Darstellung als Punktdiagramm. Ein Punkt entspricht einem Probanden. Mittelwerte werden mittels der horizontalen Linie veranschaulicht. Die p-Werte wurden mittels Mann-Whitney U Test berechnet. $p < 0,05$ wird als statistisch signifikant (*) gewertet. HC = *healthy control*, SLE = SLE-Patienten, CD = *cluster of differentiation*, B_{reg} = regulatorische B-Zellen.

3.1.2 Resultate der Genexpressionsanalyse an B-Zellen

3.1.2.1 Ergebnisse der mRNA-Expression von Zytokinen und Zytokinrezeptoren

Bei der Auswertung der Ergebnisse der mRNA-Expression auf humanen B-Zellen für die Zytokine TGF- β 1 ($p = 0,1402$), 95 % KI [-0,4341, -0,0557] und IL-10 ($p = 0,9692$), 95 % KI [-0,3341, 0,4220] sowie für den IL-21-Rezeptor ($p = 0,1171$) 95 % KI [-0,5046, 0,06968] konnten entgegen unserer Erwartungen keine statistisch signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen Gesunden und SLE-Patienten festgestellt werden. Die mRNA-Expression beider Untereinheiten von IL-35 (EBI3 und IL-12A) zeigte sich bei SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden erniedrigt. Die Ergebnisse hierzu waren sowohl bei EBI3 ($p = 0,040$), 95 % KI [-0,5364, 0,0042] als auch bei IL-12A ($p = 0,0002$), 95 % KI [-0,7424, -0,1154] statistisch signifikant. Die mRNA-

Expression des untersuchten TNFR1 auf B-Zellen war bei SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen statistisch signifikant erhöht ($p = 0,0491$), 95 % KI [-0,002423, 1,075]. Die Ergebnisse sind in Abb. 11 zusammenfassend dargestellt.

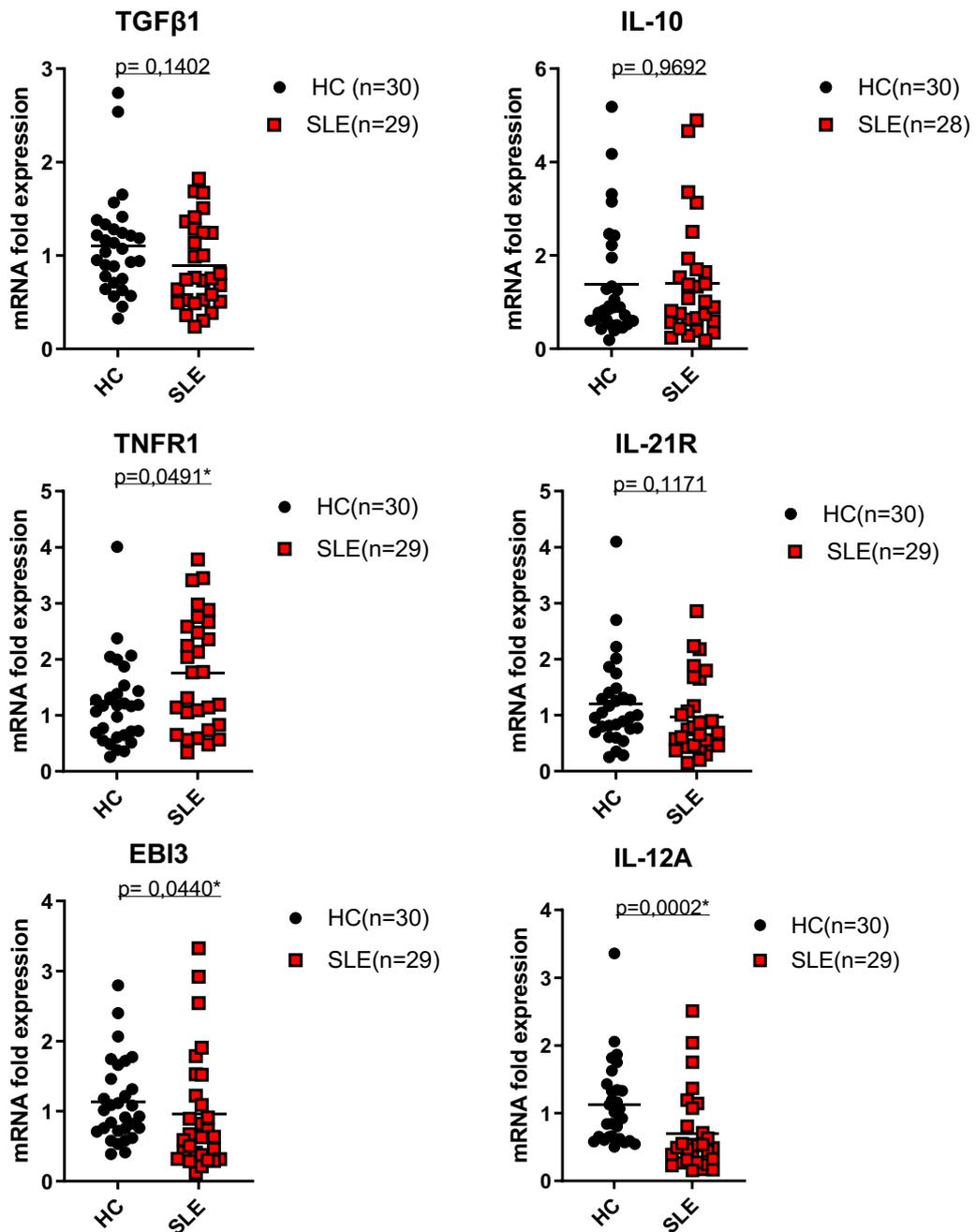


Abb. 11: mRNA-Expression der Zytokine und Zytokinrezeptoren in humanen B-Zellen bei Gesunden und SLE-Patienten

Mittels qRT-PCR analysierte mRNA-Expression der untersuchten Zytokine und Zytokinrezeptoren an humanen B-Zellen im Vergleich zwischen gesunden Probanden (*healthy controls* = HC) und SLE-Patienten (SLE). Darstellung als Punktdiagramm, wobei jeder Punkt einem Probanden entspricht. Mittelwerte werden mittels der horizontalen Linie veranschaulicht. Die p-Werte wurden mittels Mann-Whitney U Test berechnet. $p < 0,05$ wird als statistisch signifikant (*) gewertet. IL = Interleukin, IL-21R = Interleukin-21-Rezeptor, TNFR = TNF α -Rezeptor, TGF β = *tumor growth factor beta*, mRNA = *messenger ribonucleic acid*.

3.1.2.2 Ergebnisse der mRNA-Expression des A3R

Wir konnten bei der Untersuchung des A3R bei Berechnung mittels Mann-Whitney U Test statistisch signifikante Unterschiede der mRNA-Expression auf humanen B-Zellen zwischen gesunden Probanden und SLE-Patienten feststellen ($p = 0,0056$), 95 % KI [0,198, 1,385]. B-Zellen von SLE-Patienten wiesen hierbei eine erhöhte Expression an A3R auf (s. Abb. 12).

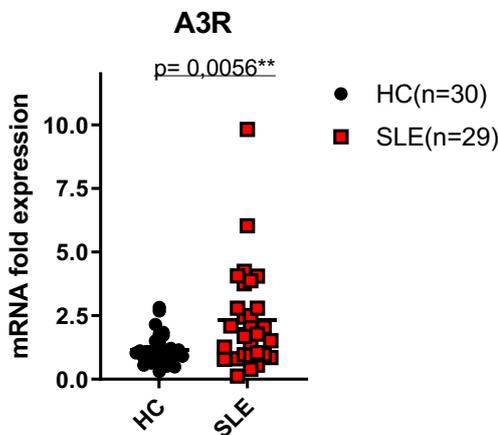


Abb. 12: mRNA-Expression des untersuchten A3R in humanen B-Zellen bei Gesunden und SLE-Patienten

Mittels qRT-PCR analysierte mRNA-Expression des untersuchten A3R an humanen B-Zellen im Vergleich zwischen gesunden Probanden (*healthy controls* = HC) und SLE-Patienten (SLE). Darstellung als Punktdiagramm. Ein Punkt entspricht einem Probanden. Mittelwerte werden mittels der horizontalen Linie veranschaulicht. Die p-Werte wurden mittels Mann-Whitney U Test berechnet. $p < 0,05$ wird als statistisch signifikant (*) gewertet. A3R = Adenosin A3 Rezeptor, mRNA = *messenger ribonucleic acid*.

3.2 Resultate Suppressionsassays

Bei den betrachteten T-Zellen handelte es sich bei gesunden Probanden im Mittel bei 68,03 % um CD4+ T-Zellen und bei 29,02 % um CD8+ T-Zellen. Ein geringer Teil zeigte sich sowohl CD4+, als auch CD8+ (2,95 %). Bei den SLE-Patienten handelte es sich im Mittel bei 68,58 % um CD4+ T-Zellen, bei 26,71 % um CD8+ T-Zellen und bei 4,69 % um CD4+CD8+ T-Zellen. Die CD4+CD8+ T-Zellen wurden bei der Auswertung der Gesamt-T-Zellen miteinbezogen, jedoch aufgrund des äußerst geringen Anteils nicht separat ausgewertet. Generell konnten wir in der Auswertung bei SLE-Patienten deutlich größere Varianzen beobachten. Unter Verwendung eines linearen Regressi-

onsmodells (*linear mixed model*) ergaben sich die im Folgenden aufgeführten Ergebnisse. Insgesamt muss hierzu angemerkt werden, dass in diesem Abschnitt, im Hinblick auf die Diskussion der Resultate, nur von allgemeinen Tendenzen berichtet werden soll. Bis auf wenige Ausnahmen bei der Untersuchung der A3R-Agonisten und -Antagonisten in der Gruppe der gesunden Kontrollen, konnten hier keine statistisch signifikanten Ergebnisse beobachtet werden.

Wir sahen uns zunächst das proliferative Verhalten der T-Zellen bei gesunden Probanden und SLE-Patienten ohne Hinzugabe von B-Zellen an. Hierbei konnten wir eine tendenziell geringere Proliferation der T-Zellen von SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden beobachten. Unter Betrachtung der MFI ergab sich hier ein *fixed effect* von 3,137, 95 % KI [-11,611, 17,883], ($p = 0,646$). Insgesamt zeigte sich bei Hinzugabe der B-Zellen bei Gesunden eine tendenzielle Zunahme der Proliferation, während bei SLE-Patienten kaum Effekte wahrzunehmen waren. Im Vergleich zu den T-Zellen, welche im 1:1 Verhältnis (B-Zellen zu Rest-PBMCs) inkubiert wurden, könnte man bei denjenigen mit Hinzugabe von B-Zellen im 10:1 Verhältnis unter den Gesunden bei einem *Intercept* von 17,51 einen tendenziell eher suppressiven Effekt der B-Zellen vermuten (*fixed effect* 2,416, 95 % KI [-3,366, 8,199], ($p = 0,346$)), während bei SLE-Patienten die Proliferation der T-Zellen, bei insgesamt verminderter Proliferation im Vergleich zu Gesunden, in diesem Falle im Mittel unverändert blieb und tendenziell sogar fraglich verstärkt wurde (*fixed effect* -0,309, 95 % KI [-10,715, 10,097], ($p = 0,944$)). Betrachteten wir den Effekt der B-Zellen, die mit CpG stimuliert wurden, konnten wir auch hier keine statistisch signifikanten Ergebnisse beobachten. Rein deskriptiv unter Betrachtung des *fixed effect* zeigte sich sowohl bei den gesunden Probanden (*fixed effect* 0,631, 95 % KI [-2,813, 4,076], ($p = 0,677$)), als auch bei den SLE-Patienten eine tendenziell leicht suppressive Wirkung (*fixed effect* 0,288, 95 % KI [-5,643, 6,218], ($p = 0,912$)), wobei auch hier aufgrund der Breite des Konfidenzintervalls keine statistisch signifikanten Effekte vorliegen.

Die beschriebenen Tendenzen konnten wir unter Betrachtung des prozentualen Anteils proliferierter T-Zellen zum Teil deutlicher sehen. Hier ergaben sich bei Hinzugabe unstimulierter B-Zellen bei einem *Intercept* von 79,07 % bei Gesunden ein tendenziell suppressiver Effekt von -5,612, 95 % KI [-12,444, 1,218], ($p = 0,091$) mit statistischem Trend, und bei SLE-Patienten eine eher proliferative Tendenz von 3,598, 95 % KI [-8,771, 15,968], ($p = 0,503$). Bei Hinzugabe von B-Zellen, die zuvor mit CpG stimuliert worden waren, konnten wir bei Gesunden weiterhin eine tendenzielle Suppression der T-Zell-Proliferation feststellen (*fixed effect* -2,544, 95 % KI [-7,224, 2,137], ($p = 0,239$)), während der tendenziell proliferative Effekt der B-Zellen bei SLE-Patienten vermindert

wurde (*fixed effect* 1,567, 95 % KI [-6,508, 9,642], ($p = 0,660$)). Die gleichen Tendenzen konnten wir auch unter Betrachtung der CD4+ T-Zellen und CD8+ T-Zellen separat voneinander feststellen. Unter diesen Beobachtungen ließen sich keine statistisch signifikanten Effekte verzeichnen.

Unter allen nur mit Anti-CD3, Anti-CD28, sowie CpG stimulierten Proben zeigte sich ein tendenzieller Unterschied der MFI zwischen SLE-Patienten und gesunden Probanden. Hierbei zeigt sich die MFI der Gesamt-T-Zellen bei SLE-Patienten höher als bei den Gesunden (*fixed effect* 7,245, 95 % KI [-7,373, 21,865], ($p = 0,291$)), sodass also bei den Proben der SLE-Patienten eine insgesamt geringere Proliferation der T-Zellen denkbar wäre. Diese Tendenz konnte auch bei separater Auswertung der CD4+ T-Zellen (*fixed effect* 5,742, 95 % KI [-8,361, 19,846], ($p = 0,381$)) und CD8+ T-Zellen (*fixed effect* 7,643, 95 % KI [-9,404, 24,689], ($p = 0,336$)) festgestellt werden und zeigte sich ebenso bei der Betrachtung des prozentualen Anteils proliferierter Zellen. Am Beispiel proliferierter T-Zellen zeigte sich hier bei einem *Intercept* von 77,57 % ein *fixed effect* von -11,26 (95 % KI [-36,07, 13,55], ($p = 0,331$)). Von statistisch signifikanten Unterschieden können wir hier jedoch nicht berichten.

Zur Auswertung der Wirkung des A3R-Agonisten und -Antagonisten werteten wir zunächst die Gesamtwirkung auf die stimulierten Zellen unabhängig von der eingesetzten Konzentration aus. Im *linear mixed model* (s. Punkt 2.5.6) zeigte sich hier bei gesunden Probanden eine negative Assoziation zwischen der Hinzugabe des Agonisten und der MFI der T-Zellen (*fixed effect* -1,052, 95 % KI [-2,967, 0,863], ($p = 0,273$)), während sich bei SLE-Patienten eine tendenzielle Zunahme der MFI verzeichnen ließ (*fixed effect* 1,123, 95 % KI [-1,645, 3,892], ($p = 0,416$)). Es kam somit unter Hinzugabe des A3R-Agonisten insgesamt zu einer tendenziell stärkeren Proliferation der T-Zellen bei Gesunden, aber zu einer tendenziell verminderten Proliferation bei SLE-Patienten. Die gleichen Tendenzen zeigten sich auch bei Betrachtung der CD4+ T-Zellen und CD8+ T-Zellen getrennt voneinander. Diese waren jedoch bei breiten Konfidenzintervallen gering und nicht statistisch signifikant. Unter Betrachtung der Wirkung der Antagonisten auf die T-Zell Proliferation, sah man interessanterweise ähnliche Resultate. Bei den gesunden Probanden zeigte sich hier ein statistischer Trend mit negativer Korrelation zwischen der Hinzugabe der Antagonisten und der MFI (*fixed effect* -1,745, 95 % KI [-3,585, 0,094], ($p = 0,063$)), während bei den SLE-Patienten eine tendenzielle Zunahme der MFI, also eine verminderte Proliferation, zu verzeichnen war (*fixed effect* 1,121, 95 % KI [-1,482, 3,726], ($p = 0,388$)). Auch hier ergaben sich die gleichen Tendenzen

unter Betrachtung der CD4+ und CD8+ T-Zellen separat voneinander. Statistisch signifikante Ergebnisse konnten wir auch hier nicht feststellen.

Für die weitere Auswertung betrachteten wir auf gleiche Weise anhand der im 10:1 Verhältnis (B-Zellen zu Rest-PBMCs) inkubierten Proben die Wirkung des Agonisten und Antagonisten in den jeweils unterschiedlichen Konzentrationen auf die MFI, und somit auf die Stärke der Proliferation. Es zeigten sich auch hier keine statistisch signifikanten Unterschiede. Bei genauer Betrachtung der Resultate zeigte sich bei den gesunden Probanden unter Wirkung der Agonisten eine tendenziell verstärkte Proliferation, wobei die stärkste Tendenz bei der Konzentration 100 nM festgestellt werden konnte (*fixed effect* -2,099, 95 % KI [-4,634, 0,435], ($p = 0,101$)), während sie bei den Konzentrationen von 50 nM (*fixed effect* -0,558, 95 % KI [-3,318, 2,202], ($p = 0,681$)) und 200 nM (*fixed effect* -1,344, 95 % KI [-3,976, 1,286], ($p = 0,303$)) etwas geringer war. Im Gegensatz hierzu konnten wir bei SLE-Patienten unter Hinzugabe des Agonisten tendenziell insgesamt schwächere Effekte feststellen, wobei auch hier eine geringe Tendenz in der Konzentration von 100 nM zu verzeichnen war (*fixed effect* 1,108, 95 % KI [-2,307, 4,524], ($p = 0,511$)), während auch hier bei 50 nM (*fixed effect* 0,657, 95 % KI [-3,177, 4,492], ($p = 0,727$)) und 200 nM (*fixed effect* -0,006, 95 % KI [-3,539, 3,527], ($p = 0,997$)) kein Unterschied festgestellt werden konnte. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammenfassend dargestellt.

Agonistenkonzentration	<i>fixed effect</i>	95 %-KI	p-Wert	<i>Intercept</i>
HC 50 nM	-0,558	[-3,318, 2,202]	0,681	18,38
HC 100 nM	-2,099	[-4,634, 0,435]	0,101	18,38
HC 200 nM	-1,344	[-3,976, 1,286]	0,303	18,38
SLE 50 nM	0,657	[-3,177, 4,492]	0,727	25,44
SLE 100 nM	1,108	[-2,307, 4,524]	0,511	25,44
SLE 200 nM	-0,006	[-3,539, 3,527]	0,997	25,44

Tabelle 9: Übersicht der Ergebnisse zur Wirkung der A3-Adenosinrezeptor-Agonisten auf die MFI (*mean fluorescence intensity*) der T-Zellen. Die Werte wurden mittels *linear mixed model* berechnet. HC = *healthy controls*, SLE = SLE-Patienten (rot hinterlegt), KI = Konfidenzintervall, nM = Nanomolar.

Unter Einwirkung des Antagonisten zeigten sich überraschenderweise ähnliche Wirkungen auf die MFI, wie bei Hinzugabe des Agonisten. Auch hier konnte bei den Gesunden die stärkste negative Korrelation mit der MFI bei einer Konzentration von 100 nM festgestellt werden (*fixed effect* -2,845, 95 % KI [-5,751, 0,061], ($p = 0,055$)), während sie bei 50 nM (*fixed effect* -1,225, 95 % KI [-4,190, 1,741], ($p = 0,402$)) und 200 nM (*fixed effect* -2,056, 95 % KI [-5,290, 1,177], ($p = 0,201$)) geringer war. Hier ließ sich ein statistischer Trend in der Konzentration 100 nM sehen. Bei SLE-Patienten zeigte sich ebenfalls der stärkste Effekt bei 100 nM (*fixed effect* 1,932, 95 % KI [-1,873,

5,737], ($p = 0,305$)), wobei hier eine positive Korrelation zwischen der Hinzugabe des Antagonisten und der MFI zu verzeichnen war. Bei 50 nM (*fixed effect* -0,233, 95 % KI [-4,350, 3,884], ($p = 0,908$)) und 200 nM (*fixed effect* 0,529, 95 % KI [-3,577, 4,636], ($p = 0,792$)) zeigte sich hingegen auch hier eine geringere Wirkung, wobei bei SLE-Patienten kein statistischer Trend beobachtet werden konnte. Die zugehörigen Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammenfassend dargestellt.

Antagonistenkonzentration	<i>fixed effect</i>	95 %-KI	p-Wert	<i>Intercept</i>
HC 50 nM	-1,225	[-4,190, 1,741]	0,402	18,39
HC 100 nM	-2,845	[-5,751, 0,061]	0,055	18,39
HC 200 nM	-2,056	[-5,290, 1,177]	0,201	18,39
SLE 50 nM	-0,233	[-4,350, 3,884]	0,908	25,44
SLE 100 nM	1,932	[-1,873, 5,737]	0,305	25,44
SLE 200 nM	0,529	[-3,577, 4,636]	0,792	25,44

Tabelle 10: Übersicht der Ergebnisse zur Wirkung der A3-Adenosinrezeptor-Antagonisten auf die MFI (*mean fluorescence intensity*) der T-Zellen. Die Werte wurden mittels *linear mixed model* berechnet. Der statistische Trend ($p < 0,1$) ist fett markiert. HC = *healthy controls*, SLE = SLE-Patienten (rot hinterlegt), KI = Konfidenzintervall, nM = Nanomolar.

Bei Betrachtung der CD4+ T-Zellen und CD8+ T-Zellen getrennt voneinander zeigten sich sowohl beim Einsatz des Agonisten als auch beim Einsatz des Antagonisten, die gleichen Tendenzen, wobei bei den CD8+ T-Zellen der stärkste Effekt bei der 50 nM Konzentration bei SLE-Patienten gesehen wurde. Insgesamt sah man also sowohl bei Verwendung des Agonisten, als auch bei Verwendung des Antagonisten, eine tendenzielle Zunahme der Proliferation der T-Zellen bei den Gesunden, während es bei SLE-Patienten zu einer verminderten Stärke der T-Zell-Proliferation kam. Es konnten jedoch keine statistisch signifikanten Ergebnisse beobachtet werden. Die Werte werden in Abb. 13 graphisch dargestellt.

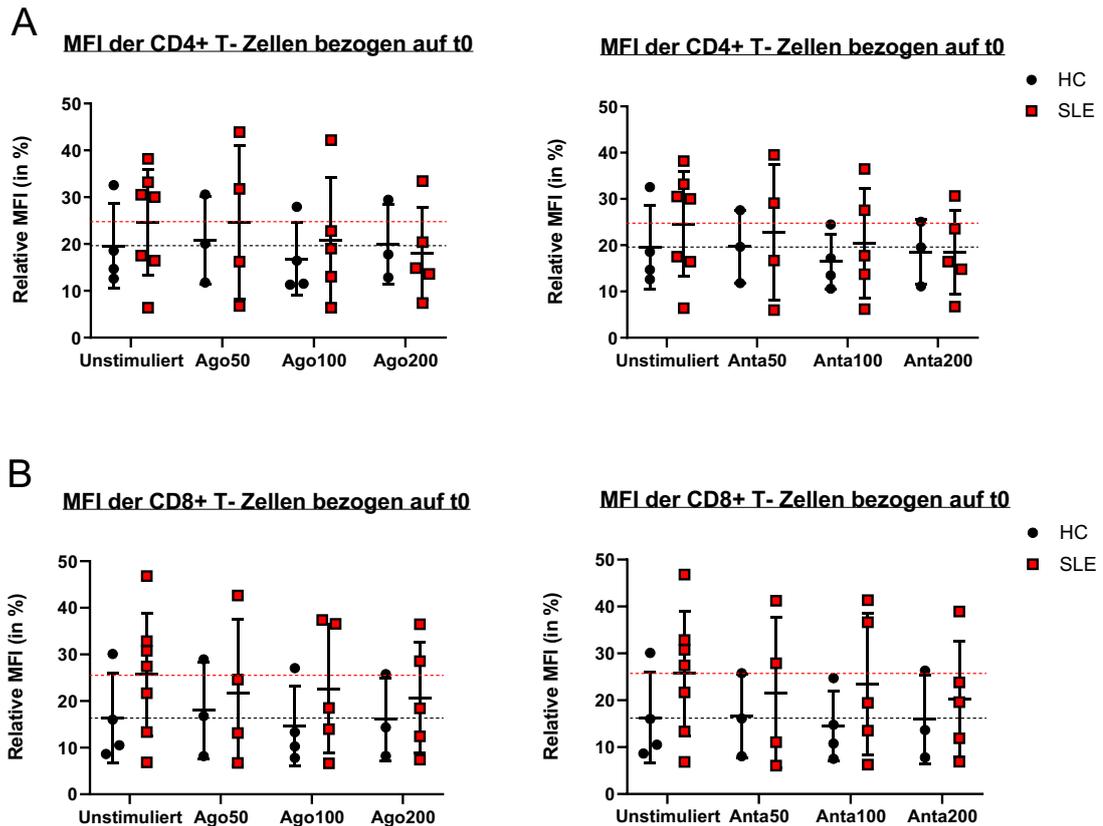


Abb. 13: Relative MFI der T-Zellen bezogen auf den Zeitpunkt 0 (t0) unter Hinzugabe der A3R-Agonisten und -Antagonisten im Vergleich zu nicht mit diesen stimulierten Proben am Beispiel der 10:1 Konzentration an B-Zellen zu Rest-PBMCs.

Die T-Zellen wurden mit Anti-CD3 und Anti-CD28 stimuliert. Die B-Zellen wurden mit CpG stimuliert. (n = 3-7). (A) Mittels Durchflusszytometrie untersuchte MFI der CD4+ T-Zellen nach 72 Stunden bezogen auf die MFI zum Zeitpunkt t0 im Vergleich zwischen gesunden Probanden (*healthy controls* = HC) und SLE-Patienten (SLE). Darstellung als Punktdiagramm. Mittelwerte werden mittels der horizontalen Linie veranschaulicht. Standardabweichungen sind mittels vertikaler Linien dargestellt. Die horizontalen gestrichelten Linien sollen die Ausgangswerte der Proben ohne Agonisten und Antagonisten besser veranschaulichen (SLE = rot, HC = schwarz). Im linken Diagramm ist die Wirkung der Agonisten und im rechten Diagramm die Wirkung der Antagonisten jeweils in den Konzentrationen 50 nM, 100 nM und 200 nM aufgeführt. (B) Darstellung der relativen MFI der CD8+ T-Zellen analog zu (A). MFI = *mean fluorescence intensity*, Ago = A3-Adenosinrezeptor-Agonist, Anta = A3-Adenosinrezeptor-Antagonist, CD = *Cluster of differentiation*.

Zuletzt betrachteten wir die Wirkung der verwendeten Substanzen auf die prozentuale T-Zell-Proliferation. So wurde im Gegensatz zur Auswertung der MFI nicht auf die Stärke der Proliferation geachtet, sondern nur auf den Anteil der T-Zellen, die überhaupt zur Proliferation angeregt wurden. Bei Betrachtung der Gesamtwirkung auf die stimulierten Zellen unabhängig von der eingesetzten Konzentration sahen wir in dem Fall bei gesunden Probanden bei einem *Intercept* von 77,48 % eine geringe positive Assoziation zwischen der Hinzugabe des Agonisten und der prozentualen Proliferation der T-Zellen (*fixed effect* 1,395, 95 % KI [-1,172, 3,963], ($p = 0,278$)). Auch bei SLE-Patienten zeigte sich eine tendenzielle Zunahme der prozentualen Proliferation (*fixed*

effect 0,277, 95 % KI [-3,436, 3,990], ($p = 0,881$)). Die gleichen Tendenzen zeigten sich auch bei Betrachtung der CD4+ T-Zellen und CD8+ T-Zellen getrennt voneinander, wobei der Effekt auf CD8+ T-Zellen etwas stärker war. Die zu verzeichnenden Tendenzen waren jedoch insgesamt sehr gering und nicht statistisch signifikant. Auch hier zeigte sich bei Anwendung der Antagonisten eine ähnliche Wirkung auf die T-Zell-Proliferation. Bei den gesunden Probanden sah man bei einem Intercept von 77,56 % eine positive Assoziation mit statistischem Trend (*fixed effect* 1,979, 95 % KI [-0,246, 4,205], ($p = 0,079$)), während bei den SLE-Patienten kein Effekt zu verzeichnen war (*fixed effect* 0,030, 95 % KI [-3,122, 3,182], ($p = 0,984$)). Auch hier ergaben sich die gleichen Tendenzen unter Betrachtung der CD4+ und CD8+ T-Zellen separat voneinander. Statistisch signifikante Ergebnisse konnten wir auch hier nicht feststellen.

Anhand der im 10:1 Verhältnis inkubierten Proben betrachteten wir ebenfalls die Wirkung des Agonisten und Antagonisten in den jeweils unterschiedlichen Konzentrationen auf die prozentuale Proliferation der T-Zellen. Hierbei zeigte sich bei den gesunden Probanden bei einem *Intercept* von 76,25 % unter Wirkung der Agonisten eine tendenziell verstärkte Proliferation, wobei wir den stärksten, statistisch signifikanten Effekt bei der Konzentration 100 nM sahen (*fixed effect* 3,966, 95 % KI [0,299, 7,632], ($p = 0,035$)), während er bei den Konzentrationen von 50 nM (*fixed effect* 1,211, 95 % KI [-2,782, 5,204], ($p = 0,538$)) und 200 nM (*fixed effect* 2,491, 95 % KI [-1,315, 6,297], ($p = 0,190$)) geringer und nicht statistisch signifikant war. Im Gegensatz hierzu konnten wir bei SLE-Patienten unter Hinzugabe des Agonisten insgesamt schwächere Tendenzen feststellen, welche denen bei gesunden Probanden entgegengesetzt waren, wobei auch hier die stärkste Tendenz in der Konzentration von 100 nM zu verzeichnen war (*fixed effect* -1,863, 95 % KI [-6,804, 3,078], ($p = 0,445$)), während bei 50 nM (*fixed effect* -0,142, 95 % KI [-5,689, 5,406], ($p = 0,958$)) und 200 nM (*fixed effect* 0,473, 95 % KI [-4,638, 5,584], ($p = 0,851$)) kein Effekt festgestellt werden konnte. Bei den Proben der SLE-Patienten konnten wir keine statistisch signifikanten Resultate beobachten (s. Tabelle 11).

Agonistenkonzentration	<i>fixed effect</i>	95 %-KI	p-Wert	<i>Intercept</i>
HC 50 nM	1,211	[-2,782, 5,204]	0,538	76,25%
HC 100 nM	3,966	[0,299, 7,632]	0,035*	76,25%
HC 200 nM	2,491	[-1,315, 6,297]	0,190	76,25%
SLE 50 nM	-0,142	[-5,689, 5,406]	0,985	66,15%
SLE 100 nM	-1,863	[-6,804, 3,078]	0,445	66,15%
SLE 200 nM	0,473	[-4,638, 5,584]	0,851	66,15%

Tabelle 11: Übersicht der Ergebnisse zur Wirkung der A3-Adenosinrezeptor-Agonisten auf die prozentuale Proliferation der T-Zellen. Die Werte wurden mittels *linear mixed model* berechnet. $p < 0,05$ wird als statistisch signifikant (*) gewertet. HC = *healthy controls*, SLE = SLE-Patienten (rot hinterlegt), KI = Konfidenzintervall, nM = Nanomolar.

Unter Einwirkung des Antagonisten ließen sich auch unter Betrachtung des prozentualen Anteils proliferierter Zellen ähnliche Wirkungen beobachten, wie bei Hinzugabe des Agonisten. Auch hier konnte bei den Gesunden die stärkste positive Korrelation bei einer Konzentration von 100 nM festgestellt werden (*fixed effect* 4,939, 95 % KI [1,193, 7,985], ($p = 0,003$)), während sie bei 50 nM (*fixed effect* 0,936, 95 % KI [-2,173, 4,046], ($p = 0,539$)) und 200 nM (*fixed effect* 3,965, 95 % KI [0,574, 7,355], ($p = 0,024$)) geringer war. Hier sahen wir sowohl in der 100 nM Konzentration, als auch in der 200 nM Konzentration statistisch signifikante Effekte. Bei SLE-Patienten zeigte sich, jedoch bei negativer Korrelation, ebenfalls die stärkste Tendenz bei 100 nM (*fixed effect* -2,751, 95 % KI [-6,741, 1,239], ($p = 0,167$)). Bei 50 nM (*fixed effect* 0,144, 95 % KI [-4,174, 4,461], ($p = 0,946$)) und 200 nM (*fixed effect* -1,157, 95 % KI [-5,463, 3,149], ($p = 0,584$)) zeigten sich keine, bzw. kaum Unterschiede. Auch hier waren die Unterschiede bei Proben der SLE-Patienten nicht statistisch signifikant. Die Ergebnisse hierzu sind in Tabelle 12 zusammenfassend dargestellt.

Antagonistenkonzentration	<i>fixed effect</i>	95 %-KI	p-Wert	<i>Intercept</i>
HC 50 nM	0,936	[-2,173, 4,046]	0,539	76,14%
HC 100 nM	4,939	[1,193, 7,985]	0,003*	76,14%
HC 200 nM	3,965	[0,574, 7,355]	0,024*	76,14%
SLE 50 nM	0,144	[-4,174, 4,461]	0,946	66,15%
SLE 100 nM	-2,751	[-6,741, 1,239]	0,167	66,15%
SLE 200 nM	-1,157	[-5,463, 3,149]	0,584	66,15%

Tabelle 12: Übersicht der Ergebnisse zur Wirkung der A3-Adenosinrezeptor-Antagonisten auf die prozentuale Proliferation der T-Zellen. Die Werte wurden mittels *linear mixed model* berechnet. $p < 0,05$ wird als statistisch signifikant (*) gewertet. HC = *healthy controls*, SLE = SLE-Patienten (rot hinterlegt), KI = Konfidenzintervall.

Bei Betrachtung der CD4+ T-Zellen und CD8+ T-Zellen getrennt voneinander zeigten sich sowohl beim Einsatz des Agonisten als auch beim Einsatz des Antagonisten die gleichen Tendenzen. Insgesamt sah man also sowohl bei Verwendung des Agonisten

als auch bei Verwendung des Antagonisten eine tendenzielle Zunahme der Proliferation der T-Zellen bei den Gesunden, während es bei SLE-Patienten zu einer verminderten Stärke der T-Zell-Proliferation kam. Statistisch signifikante Ergebnisse konnten wir jedoch nur bei den gesunden Probanden unter der Konzentration 100 nM bei den Agonisten (CD4+ T-Zellen) sowie unter den Konzentrationen 100 nM und 200 nM bei den Antagonisten beobachten.

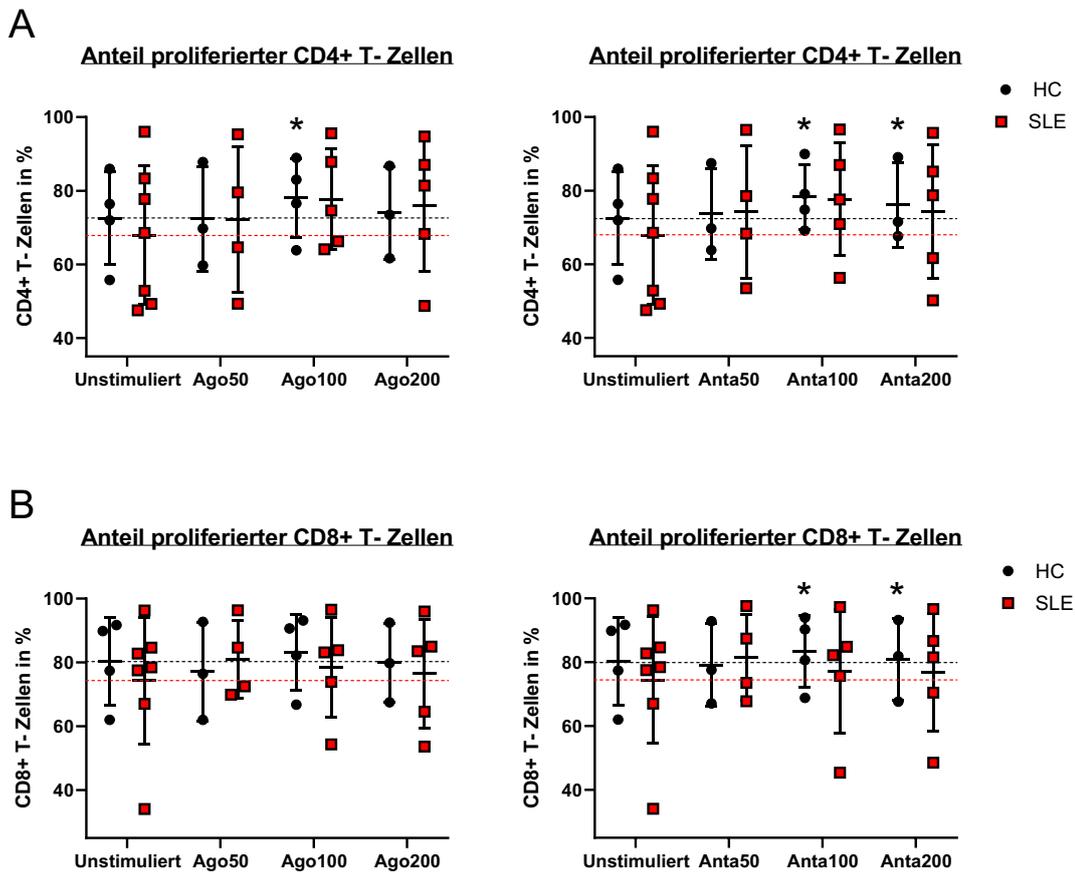


Abb. 14: Anteil proliferierter T-Zellen in Prozent zur Gesamtzellzahl unter Hinzugabe der A3R-Agonisten und -Antagonisten im Vergleich zu nicht mit diesen stimulierten Proben am Beispiel der 10:1 Konzentration an B-Zellen zu Rest-PBMCs.

Die T-Zellen wurden mit Anti-CD3 und Anti-CD28 stimuliert. Die B-Zellen wurden mit CpG stimuliert. (n = 3-7). Die Werte wurden mittels *linear mixed model* berechnet. $p < 0,05$ wird als statistisch signifikant (*) gewertet. (A) Mittels Durchflusszytometrie untersuchter Anteil proliferierter CD4+ T-Zellen (in %) im Vergleich zwischen gesunden Probanden (*healthy controls* = HC) und SLE-Patienten (SLE). Darstellung als Punktdiagramm. Mittelwerte werden mittels der horizontalen Linie veranschaulicht. Standardabweichungen sind mittels vertikaler Linie dargestellt. Die horizontalen gestrichelten Linien sollen die Ausgangswerte der Proben ohne Agonisten und Antagonisten besser veranschaulichen (SLE = rot, HC = schwarz). Im linken Diagramm ist die Wirkung der Agonisten und im rechten Diagramm die Wirkung der Antagonisten jeweils in den Konzentrationen 50 nM, 100 nM und 200 nM aufgeführt. (B) Darstellung des Anteils proliferierter CD8+ T-Zellen analog zu (A). Ago = A3-Adenosinrezeptor-Agonist, Anta = A3-Adenosinrezeptor-Antagonist, CD = *Cluster of differentiation*.

4 Diskussion

4.1 Der Anteil regulatorischer B-Zellen ist bei systemischem Lupus Erythematoses vermindert

B-Zellen haben vielfältige Aufgaben und spielen im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen zum einen aufgrund ihrer klassischen Funktionen wie der Antikörperproduktion, Antigenpräsentation und Zytokinproduktion eine große Rolle, sind jedoch auch anlässlich ihrer inhibitorischen Funktionen als regulatorische B-Zellen von Interesse (11, 13–15, 167). In zahlreichen Studien wurden innerhalb der letzten Jahre sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen anhand verschiedener Oberflächenmarker und Funktionen unterschiedliche B-Zell-Subpopulationen als B_{reg} definiert, wobei eine einheitliche Charakterisierung weiterhin ausstehend ist (16–20, 168). Zu den in der Literatur beschriebenen auf B_{reg} exprimierten Oberflächenmarkern gehören CD19, CD5, CD1d, CD24, CD25, CD27, CD38 und IgM, wobei nach Stimulation vereinzelt auch weitere Oberflächenmarker festgestellt werden konnten (17, 20, 21, 24, 26, 29, 30, 34, 45). Die in verschiedenen Arbeitsgruppen untersuchten B_{reg} -Populationen mit ihren Wirkmechanismen wurden unter Punkt 1.2.4 bereits ausführlich dargelegt. Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass sowohl $CD19+CD5+ B_{reg}$ und $CD19+CD5+CD1d+ B_{reg}$, die zuvor als IL-10- und TGF- β -produzierend identifiziert wurden (20, 26, 31), als auch eine anhand von zuvor beschriebenen Oberflächenmarkern hier neu vorgeschlagene $CD19+IgM+CD24+CD23-CD1d+CD5+ B_{reg}$ -Population bei SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden statistisch signifikant vermindert sind. Unsere Ergebnisse zeigten sich somit beispielsweise mit denen der Arbeitsgruppe Li Wang et al. übereinstimmend, die ebenfalls erniedrigte Zellzahlen von $CD19+CD5+$ und $CD19+CD5+CD1d+ B_{reg}$ bei SLE-Patienten beobachten konnte, obwohl hier im Gegensatz zu unserer Patientengruppe keine in klinischer Remission befindlichen Patienten, sondern Patienten mit neu aufgetretenem SLE untersucht wurden (45). Bei Patienten, die eine Therapie erhielten, konnte hier nach 12 Wochen eine Normalisierung der Zellzahl beobachtet werden (45). Eine erniedrigte Anzahl $CD19+CD5+ B_{reg}$ bei SLE-Patienten im Vergleich zu Gesunden konnte auch durch die Arbeitsgruppe Zhuang Ye et al. festgestellt werden, welche jedoch ebenfalls Patienten mit neu aufgetretenem SLE untersuchte (46). In dieser Studie konnte zudem eine inverse Korrelation zwischen Krankheitsaktivität und B_{reg} -Anzahl festgestellt werden, was teilweise deutlich von anderen Studienergebnissen abweicht. Es gibt jedoch auch Studien, die gegenteilige Ergebnisse zeigen. In einer Arbeit von Yang et al. aus dem Jahr 2014 konnte beispielsweise ein erhöhter Anteil an $CD19+CD5+CD1d+ B_{reg}$ im Blut von SLE-Patienten so-

wohl bei Patienten mit aktivem SLE als auch bei solchen mit geringer Krankheitsaktivität (hier als SLEDAI <6 definiert) gemessen, und eine positive Korrelation zwischen Krankheitsaktivität und B_{reg} -Anzahl festgestellt werden (42). Hier könnten möglicherweise Unterschiede in der Gating-Strategie ursächlich für die diskrepanten Ergebnisse im Vergleich zu dieser und anderen Arbeiten sein, da in dieser Studie nur solche Zellen mit sehr hoher CD5 und CD1d Expression in die Auswertung einbezogen wurden. Es gibt nach heutigem Kenntnisstand keine Studien, welche die CD19+IgM+CD24+CD23-CD1d+CD5+ B_{reg} -Population in dieser Form bei SLE-Patienten untersucht haben. Die Arbeitsgruppe um Menon et al. isolierte CD19+ B-Zellen aus dem Blut von gesunden Probanden und SLE Patienten, definierte B_{reg} als CD24+CD38+ B-Zelle, welche hier zusätzlich eine Expression von IgM und IgD zeigten (169). Auch hier konnte eine inverse Korrelation zwischen Krankheitsaktivität und B_{reg} -Anzahl festgestellt werden, wobei hier zusätzlich ein genereller Defekt von B-Zellen bei SLE-Patienten postuliert wurde, da diese weniger erfolgreich zur Differenzierung zu B_{reg} stimuliert werden konnten (169). Ebenfalls als CD19+CD24+CD38+ wurden B_{reg} durch die Arbeitsgruppe um Blair et al. definiert, welche bei SLE-Patienten jedoch sowohl im Vergleich zu gesunden Probanden als auch im Vergleich zu anderen hier untersuchten Autoimmunerkrankungen, einen erhöhten Anteil regulatorischer B-Zellen im Blut feststellen konnte (21). Hier wurde zudem eine herabgesetzte immunregulatorische Funktion von B_{reg} bei SLE vermutet, da nach Entfernung der B_{reg} aus Zellkulturen bei Gesunden eine deutliche Zunahme der Proliferation von T-Zellen verzeichnet werden konnte, während sie bei SLE-Patienten ausblieb (21). Anzumerken ist hierbei, dass nur Patienten mit aktivem SLE in diese Studie eingeschlossen wurden. Auch in einer weiteren Arbeit wurden erhöhte Anteile CD19+CD24+CD38+ B_{reg} bei SLE-Patienten festgestellt, welche hier jedoch keine Korrelation zur Krankheitsaktivität zeigten (43). Wir konnten im Rahmen dieser Arbeit eine erniedrigte Anzahl der untersuchten B_{reg} bei SLE-Patienten demonstrieren, wobei eine abschließende Interpretation bei uneinheitlicher Studienlage, die beispielsweise durch unterschiedlich definierte B_{reg} -Populationen, Unterschiede in der Krankheitsaktivität oder die verschiedenen Analysemethoden geprägt ist, erschwert wird. In vielen Studien an Gesunden konnte durch verschiedene Stimulantien, die z. B. über CD40 oder TLR9 wirkten, eine Entstehung oder Hochregulierung von B_{reg} oder der inhibitorischen Funktionen von B-Zellen erreicht werden, während dies bei SLE-Patienten erschwert war (21, 24, 35–38, 40). Ursächlich für einen verminderten Anteil von B_{reg} bei SLE-Patienten wäre somit zum einen ein Defekt der B_{reg} selbst und zum anderen ein Fehlen oder Defekt von Faktoren, die zu B_{reg} -Differenzierung dienen, bei SLE-Patienten denkbar.

4.1.1 CD11c lässt sich auf regulatorischen B-Zellen nachgewiesen und ist bei SLE-Patienten vermehrt

Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass CD11c auf der überwiegenden Zahl der von uns untersuchten Populationen regulatorischer B-Zellen exprimiert wird. Zudem konnten wir beobachten, dass zwar beide untersuchten CD11c+ B-Zell-Populationen (CD19+CD5+CD1d+CD11c+ und CD19+IgM+CD24+CD23-CD1d+CD5+CD11c+ B-Zellen) insgesamt bei SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden vermindert waren, der Anteil an B_{reg} , die zusätzlich CD11c auf ihrer Oberfläche exprimierten jedoch bei SLE-Patienten statistisch signifikant erhöht war. Diese Ergebnisse zeigen sich mit anderen Studien tendenziell übereinstimmend in denen in Autoimmunerkrankungen generell, aber auch bei SLE, ein erhöhter Anteil CD11c+ B-Zellen zu beobachten war (48, 50, 51). Wir beobachteten die CD11c-Expression zwar nur auf den beschriebenen Zellpopulationen, die Ergebnisse lassen jedoch auf einen generell erhöhten Anteil von CD11c+ B-Zellen schließen. Über die Funktion von CD11c lassen sich im Rahmen dieser Arbeit keine Aussagen treffen. Da CD11c zum einen auf IL-10-produzierenden B-Zellen nachgewiesen werden konnte, und zum anderen eine verstärkte mRNA-Expression von IL-10 in CD11c+ B-Zellen beobachtet wurde (17, 51), könnte sich CD11c möglicherweise als zusätzlicher Oberflächenmarker für B_{reg} herauskristallisieren. Wie unter Punkt 1.2.5 beschrieben, deutet die Studienlage insgesamt jedoch auf eine proinflammatorische Wirkung von CD11c+ B-Zellen hin. In der erwähnten Studie von Golinski et al. wurde zwar eine erhöhte mRNA-Expression von IL-10 in CD11c+ B-Zellen beobachtet, jedoch zeigte sich hier auch eine erhöhte Expression der mRNA proinflammatorischer Zytokine (51). Sowohl in Studien an Mäusen, als auch beim Menschen, wurden CD11c+ B-Zellen zudem mit einer vermehrten Antikörperproduktion assoziiert (49, 51, 52, 170). Auch in der Studie von Wang et al. an über 200 SLE-Patienten und 147 gesunden Probanden wurde eine CD11c+ B-Zell-Population beschrieben, die zu Immunglobulinproduzierenden autoreaktiven Plasmablasten differenzierte, und so zur Pathogenese von SLE beitragen kann, sowie eine positive Korrelation mit Krankheitsmanifestation bzw. klinischer Symptomatik und erhöhten Antikörpertitern beobachtet (50). Dass CD11c also in hohem Maße auch auf solchen Zellen exprimiert wird, die in der Literatur als B_{reg} beschrieben wurden, und dies bei SLE-Patienten in erhöhtem Maße der Fall zu sein scheint, spräche eventuell für CD11c als möglichen Therapieansatz, der weiter beforscht werden sollte.

4.2 Keine Unterschiede in der mRNA-Expression von IL-10, TGF- β und dem IL-21R in B-Zellen von SLE-Patienten und Gesunden

Wir konnten in der untersuchten Population keine statistisch signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression von IL-10, TGF- β und dem IL-21R in B-Zellen zwischen gesunden Probanden und SLE-Patienten feststellen.

Beim systemischen Lupus Erythematoses konnte in verschiedenen Studien eine erhöhte Serumkonzentration von IL-10 beobachtet werden (74, 75, 171, 172). IL-10 gilt, wie bereits unter Punkt 1.2.6.1 beschrieben, aufgrund seiner vielfältigen antiinflammatorischen Funktionen auf das Immunsystem, wie beispielsweise der Hemmung von T-Zellen und Makrophagen sowie deren Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, als wichtiges immunregulatorisches Zytokin (6, 27, 59, 60, 64, 65, 173). So gehört IL-10 zu den Hauptmechanismen der immunregulatorischen Funktionen von T_{reg} und B_{reg} (6, 26–28, 67, 174). Bei SLE konnte im Mausmodell ein hemmender Effekt von IL-10 auf die Autoantikörperproduktion nachgewiesen werden (62, 72, 73). Beispielsweise konnte am murinen SLE-Modell bei Überexpression von IL-10 eine verminderte Nierenbeteiligung, eine geringere T-Zell-Aktivierung mit erniedrigten Konzentrationen an proinflammatorischen Zytokinen, sowie eine verzögerte Entstehung antinukleärer Antikörper festgestellt werden (73). Zudem konnte im Zusammenhang mit B_{reg} eine inverse Korrelation zwischen dem IL-10 Spiegel und der Krankheitsaktivität bei SLE-Patienten festgestellt werden (46). IL-10 kann jedoch auch die Plasmazelldifferenzierung und Antikörperproduktion durch B-Zellen anregen (56, 57, 62, 69, 175), sodass im Zusammenhang mit SLE auch eine pathogene Rolle denkbar ist. Bei genetisch veränderten, für SLE anfälligen Mäusen, konnte der Beginn der Entwicklung von Autoimmunität durch Gabe von IL-10 beschleunigt werden, während die Gabe von Anti-IL-10-Antikörpern zu einer Normalisierung von Anti-dsDNA-IgG-Spiegeln und einem verspäteten Krankheitsbeginn führte (176). Bei SLE-Patienten konnte im Gegensatz zu gesunden Probanden die Produktion von IgA, IgG und IgM durch PBMCs durch die Gabe von IL-10 verstärkt und mit entsprechenden Antikörpern gehemmt werden (68). Von einer weiteren Arbeitsgruppe konnte bei SLE-Patienten eine Korrelation der erhöhten IL-10-Konzentration mit der Krankheitsaktivität festgestellt werden, während in einer anderen Studie zwar ein Zusammenhang mit erhöhten Anti-SS-A/Ro-Antikörpern, jedoch kein Zusammenhang mit einer erhöhten Krankheitsaktivität festgestellt werden konnte (74, 75). Erwähnenswert ist in diesem Kontext auch eine Studie von Llorente et al., in der bei SLE-Patienten nach Gabe von Anti-IL-10-Antikörpern eine verminderte Krankheitsaktivität beobachtet wurde, sodass die Behandlung mit Kortikosteroiden reduziert wer-

den konnte (177). Allerdings wurden in diese Studie nur 6 SLE-Patienten eingeschlossen (177). Insgesamt befürwortet ein Großteil der genannten Studien einen krankheitsfördernden Effekt von IL-10 bei SLE, was die Frage nach seiner Rolle im Zusammenhang mit T_{reg} und B_{reg} in den Raum stellt. Möglicherweise ist für seine Funktion auch die Quelle des IL-10 von Bedeutung. So konnte beispielsweise durch die Arbeitsgruppe Facciotti et al. eine $CCD6+IL-7R+$, IL-10-produzierende T-Zell-Population identifiziert werden, die bei SLE-Patienten B-Zellen zur IgG-Produktion stimulieren konnte, jedoch wiederum durch eine Hemmung von IL-10 inhibiert wurde (172). In der gleichen Arbeit wurde aber über die Hemmung von IL-10 eine zunehmende über T_{FH} -Zellen vermittelte Induktion der IgG-Produktion festgestellt (172). Eine einzelne Zellpopulation unter den Leukozyten als Quelle für erhöhte IL-10 Konzentrationen bei SLE konnte nicht festgestellt werden. Es wurden bisher sowohl Monozyten und dendritische Zellen, als auch T- und B-Zellen als mögliche Quellen identifiziert (171, 172, 178, 179). Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass B-Zellen von SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden keine vermehrte IL-10 mRNA exprimieren. Unsere B-Zell-Population zeigte jedoch einen verminderten Anteil an B_{reg} , sodass eine erhöhte mRNA-Expression von IL-10 innerhalb der B_{reg} , wie sie zuvor bei SLE beschrieben wurde, dennoch denkbar wäre (42). Da wir in klinischer Remission befindliche Patienten untersuchten, kommt es möglicherweise auch nur bei verstärkter Krankheitsaktivität oder durch bestimmte Stimuli zur vermehrten mRNA-Expression und IL-10-Ausschüttung (14, 17, 24, 35, 43).

Die vielfältigen immunregulatorischen Funktionen von TGF- β und seiner Isoform TGF- β 1 wurden unter Punkt 1.2.6.2 ausführlich beschrieben. Es gibt verschiedene Studien, die sich bereits mit TGF- β im Zusammenhang mit SLE beschäftigt haben. Insgesamt deutet die Studienlage hier auf eine verminderte TGF- β -Konzentration, aber auch auf mögliche partielle Resistenzen gegenüber der immunregulatorischen Effekte von TGF- β bei SLE-Patienten hin, wobei auch hier die Studienlage nicht eindeutig ist (77, 78, 85, 86, 180, 181). Es konnte gezeigt werden, dass für SLE anfällige Mäuse weniger TGF- β 1 in ihrem lymphatischen Gewebe exprimieren als gesunde Kontrollen (86). Auch beim Menschen wurden erniedrigte TGF- β -Konzentrationen festgestellt. So konnten in einer Studie an insgesamt 150 SLE-Patientinnen erniedrigte TGF- β 1-Serumspiegel im Vergleich zu Gesunden festgestellt werden, wobei dies nur bei hoher Krankheitsaktivität der Fall war, und bei inaktiver Erkrankung keine Unterschiede beobachtet werden konnten (77). Die Arbeitsgruppe Ohtsuka et al. untersuchte die peripheren Blutlymphozyten von 38 SLE-Patienten und konnte hier ebenfalls verminderte TGF- β -Spiegel im Vergleich zu Gesunden feststellen, jedoch wurden hier Patienten mit aktiver Erkran-

kung betrachtet, und ein signifikanter Effekt konnte nur nach Stimulation der Zellen beobachtet werden (181). In dieser Studie wurden NK-Zellen als wichtige Quelle für TGF- β identifiziert. B-Zellen wiesen bei Gesunden eine insgesamt geringe Ausschüttung des Zytokins auf, wobei bei SLE-Patienten nicht genügend B-Zellen isoliert werden konnten, um eine TGF- β -Ausschüttung zu messen (181). Die Ergebnisse dieser Studien zeigen sich weitgehend übereinstimmend mit unseren an B-Zellen von in Remission befindlichen SLE-Patienten beobachteten Resultaten. Wir konnten in dieser Arbeit zwar eine tendenziell minimal erniedrigte mRNA-Expression bei B-Zellen von SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden beobachten, unsere Ergebnisse waren jedoch nicht statistisch signifikant. Es gibt bezüglich der TGF- β -Konzentration im SLE auch widersprüchliche Ergebnisse. So wurde beispielsweise in einer Studie an 284 SLE-Patienten eine Assoziation zwischen erhöhtem SLEDAI und der TGF- β -Serumkonzentration festgestellt (78). Nach Aufteilung in Gruppen je nach Krankheitsaktivität, ließ sich hier jedoch kein statistisch signifikantes Ergebnis mehr beobachten (78). TGF- β ist im Zusammenhang mit SLE aufgrund seiner Funktionen relevant, und führt am Lupusmodell bei Mäusen zu einem verlängerten Überleben und verminderten Spiegel an antinukleären Antikörpern (86, 182, 183). In einer Studie an SLE-Patienten konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation von PBMCs mit IL-2 und TGF- β zu einer verminderten Ausschüttung von IgG führt (184). Neben einer verminderten TGF- β -Konzentration bei erhöhter Krankheitsaktivität, könnte auch eine partielle Resistenz gegenüber TGF- β bei SLE eine Rolle spielen (85). Dies konnte beispielsweise in einer Studie an PBMCs gezeigt werden, in der TGF- β 1 zwar die IL-2-induzierte Proliferation bei gesunden Probanden hemmen konnte, dieser Effekt jedoch bei SLE Patienten vermindert war, wobei es hier sehr starke Schwankungen in der Gruppe der SLE-Patienten gab (85). Aufgrund der beschriebenen Funktionen von TGF- β , sowie zuvor beschriebener TGF- β -produzierender B_{reg}-Populationen wird seine Relevanz beim SLE und für mögliche therapeutische Interventionen deutlich (11, 31, 76, 93). Wir konnten zwar keine signifikanten Unterschiede in der TGF- β mRNA-Expression von B-Zellen feststellen, deutliche Unterschiede wären jedoch bei Stimulation der Zellen oder aktiver Erkrankung innerhalb derselben Patientengruppe durchaus denkbar.

Durch verschiedene Studien konnte gezeigt werden, dass IL-21 über den IL-21R mit Beteiligung verschiedener Faktoren, wie beispielsweise des BCR oder TLR9, dazu in der Lage ist B_{reg} zu induzieren, die wiederum dazu in der Lage sind Granzym B oder IL-10 zu produzieren (32, 34, 35, 185). Dennoch scheint seine Hauptfunktion die Induktion der Plasmazelldifferenzierung zu sein (101, 106, 186), was seine pathogene Rolle

im Rahmen von SLE erklärt. Insgesamt konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die IL-21 Konzentration positiv mit der Krankheitsaktivität bei SLE korrelierte (45, 187, 188). Unsere Ergebnisse bezüglich der Verteilung des IL-21R zeigten sich übereinstimmend mit anderen an CD19+ B-Zellen bei SLE-Patienten durchgeführten Studien. In einer Studie aus dem Jahr 2011 konnte kein Unterschied in der IL-21R Expression auf CD19+ B-Zellen zwischen SLE-Patienten und Gesunden festgestellt werden, wobei hier überwiegend Patienten mit inaktiver Erkrankung in die Studie eingeschlossen wurden (189). Zusätzlich konnte hier eine erhöhte Anzahl an IL-21-exprimierenden CD4+ und CD8+ T-Zellen bei SLE-Patienten gemessen werden (189). Die Arbeitsgruppe Rabani et al., die einen verminderten Anteil Granzym B-produzierender B-Zellen bei SLE-Patienten feststellte, konnte ebenso keine Unterschiede in der mRNA-Expression beobachten (190). In einer weiteren Studie aus dem Jahr 2013 konnten ebenfalls keine Unterschiede in der IL-21R mRNA auf CD19+ B-Zellen zwischen gesunden Probanden und SLE-Patienten aufgedeckt werden, wobei auch hier deutlich erhöhte IL-21 Konzentrationen in CD4+ T-Zellen gesehen wurden (191). Diese Arbeitsgruppe konnte ebenso zeigen, dass eine Blockade des IL-21/IL-21R-Weges zu einer reduzierten Anzahl Plasmazellen führte (191). Zudem konnte eine Studie am Lupusmodell in Mäusen zeigen dass IL-21R-defiziente Mäuse eine geringere Krankheitsaktivität mit verringerter Autoantikörperproduktion aufweisen (192). Szabó et al. konnte in einer anderen Studie an SLE-Patienten feststellen, dass die Blockade des IL-21R zu einer verminderten Immunglobulinproduktion führt, wobei sich hier kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Gesunden und SLE-Patienten zeigte (193). Trotz der möglichen Mitwirkung von IL-21 in der Differenzierung von B_{reg} (42, 190), spricht die aktuelle Studienlage insgesamt für ein Überwiegen seiner pathologischen Rolle im Zusammenhang mit B-Zellen beim SLE, was die Blockade des IL-21/IL-21R-Weges als therapeutischen Ansatz denkbar macht. Da sich beim SLE erhöhte IL-21-Konzentrationen bei T-Zellen, nicht aber beim IL-21R auf B-Zellen, nachweisen ließen, lassen unsere Ergebnisse in Zusammenschau mit den genannten Studien darauf schließen, dass für die Pathogenese von SLE zwar möglicherweise eine erhöhte IL-21-Ausschüttung durch T-Zellen mitverantwortlich sein könnte, jedoch nicht eine erhöhte IL-21R-Expression auf B-Zellen. Eine erhöhte Expression des IL-21R auf B_{reg} ist nicht auszuschließen, da wir in dieser Arbeit, trotz verminderter Anzahl an B_{reg} bei SLE-Patienten, keine Unterschiede in der mRNA-Expression feststellen konnten. Insgesamt kann die mRNA-Expression von Immunzellen zudem auch erniedrigt sein, wenn diese vorher nicht entsprechend stimuliert wurden (98). Über die Untersuchung der IL-12a und Ebi3 mRNA-Konzentrationen konnte jedoch gezeigt werden, dass IL-35 bei Entzündungsreaktionen, z. B. nach Reaktion auf TNF α oder IFN γ hochreguliert werden kann (99). In jedem

Fall wäre hier eine Untersuchung der weiteren Signale zur Entwicklung von B_{reg} über den IL-21R sowie die Untersuchung von IL-21 auf den jeweiligen B_{reg}-Untergruppen von Interesse.

4.3 Die mRNA-Expression von IL-35 zeigt sich in B-Zellen von SLE-Patienten vermindert

Die immunsuppressive Rolle von IL-35 und seine Relevanz im Zusammenhang mit B_{reg} wurden bereits unter den Punkten 1.2.4 und 1.2.6.3 beschrieben. Bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen konnte die protektive bzw. immunsuppressive Rolle bereits beobachtet werden (96, 97, 194). Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass die mRNA-Expression von IL-35 in B-Zellen von SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden statistisch signifikant vermindert ist, was eine Relevanz der IL-35-Produktion durch B-Zellen für die Pathogenese des SLE denkbar macht. Unsere Ergebnisse stimmen teilweise mit Hinweisen aus anderen Studien überein. Bei SLE-Patienten mit aktiver Erkrankung wurden verminderte IL-35-Serumkonzentrationen im Vergleich zu gesunden Probanden sowie im Vergleich zu Patienten mit inaktivem SLE festgestellt (195). Ein Vergleich zwischen Patienten mit inaktivem SLE und gesunden Probanden wurde hier nicht durchgeführt. Es zeigte sich zudem eine negative Korrelation zwischen IL-35-Serumspiegeln und der Krankheitsaktivität (195). In einer weiteren an 120 SLE-Patienten durchgeführten Studie zeigten sich bei aktiver Erkrankung und bei Lupusnephritis ebenfalls erniedrigte IL-35 Serumspiegel im Vergleich zu inaktiver Erkrankung, wobei hier kein Vergleich zu gesunden Probanden stattfand (196). Zudem sah man auch in dieser Arbeit eine negative Assoziation mit der Krankheitsaktivität sowie mit Anti-dsDNA-Serumspiegeln (196). Auch in der bereits oben genannten Studie, die sich mit B_{reg} bei SLE-Patienten befasste, konnten ein verminderter IL-35-Plasmaspiegel und eine inverse Korrelation zwischen Krankheitsaktivität und IL-35, aber auch eine geringere Anzahl IL-35+ B_{reg} festgestellt werden (46). Im Gegensatz hierzu wurde von der Arbeitsgruppe Qiu et al. bei SLE-Patienten mit neu diagnostiziertem SLE und hoher Krankheitsaktivität eine erhöhte IL-35-Konzentration beobachtet, wobei hier keine Korrelation mit der Krankheitsaktivität festgestellt werden konnte (197). Auch die Arbeitsgruppe Cai et al. beobachtete in einer Studie an 45 SLE-Patienten mit schweren Verläufen im Vergleich zu gesunden Probanden erhöhte IL-35-Konzentrationen sowie eine vermehrte Expression der mRNA von IL-35 und dem IL-35-Rezeptor auf PBMCs, trotz verminderter T_{reg}-Anzahl und verminderter Expression des IL-35-Rezeptors auf der Oberfläche CD4+ T-Zellen (198). Die gleiche Arbeitsgruppe konnte jedoch am Lupusmodell in Mäusen eine protektive Wirkung von IL-35 mit Besserung der Symptomatik,

geringeren ANA- und Anti-dsDNA-Titern und Abnahme der Konzentration proinflammatorischer Zytokine beobachten (199). In Zusammenschau mit unseren Ergebnissen deutet die Studienlage auf eine für die Inhibierung der Krankheitsaktivität unzureichende IL-35-Produktion bei SLE hin. Ursächlich wären hier sowohl verminderte Produktion durch T_{reg} und B_{reg} als auch Defekte im IL-35/IL-35-Rezeptor-Signalweg möglich. Die Diskrepanzen in den vorgestellten Studien können unter anderem durch Unterschiede in der untersuchten Patientenpopulation erklärt werden. So wurden zum Beispiel, wie auch in dieser Arbeit, mit Ausnahme der Arbeitsgruppe Qiu et al., die ihre Versuche an Patienten mit neu aufgetretenem therapienaivem SLE durchführte, nur Patienten mit B-Zell-depletierender Therapie von den Versuchen ausgeschlossen, nicht aber Patienten die Glukokortikoide erhalten hatten (195–198). Diesbezüglich wurden ebenfalls gegensätzliche Wirkungen, also sowohl eine Abnahme als auch eine Zunahme der IL-35-Spiegel, als Reaktion auf eine Glukokortikoidtherapie bei SLE-Patienten beschrieben (195, 197). Zudem scheint die mRNA-Expression von IL-35 bei Entzündungsreaktionen hochreguliert zu werden, sodass möglicherweise auch in unserer Patientenkohorte eine vermehrte IL-35-mRNA-Expression bei Zunahme der Krankheitsaktivität denkbar wäre (99). Insgesamt sind in Anbetracht eines denkbaren therapeutischen Ansatzes weitere Studien zu diesem Thema wünschenswert.

4.4 Erhöhte mRNA-Expression des TNFR1 auf B-Zellen von SLE-Patienten

Die Funktion von TNF α und die Komplexität der Signalwege, die über die Bindung an seine beiden Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 ausgelöst werden wurden unter Punkt 1.2.6.5 beschrieben. Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass die mRNA-Expression des TNFR1 bei B-Zellen von SLE-Patienten im Vergleich mit gesunden Probanden statistisch signifikant erhöht ist. Passend zu diesen Ergebnissen, konnte eine weitere Arbeitsgruppe bei Untersuchung von PBMCs mittels Durchflusszytometrie feststellen, dass TNFR1 bei SLE-Patienten nur auf B-Zellen erhöht ist (118). Jedoch konnten in dieser Studie bei Untersuchung der mRNA-Expression für TNFR1 keine Unterschiede zwischen SLE-Patienten und Gesunden gesehen werden. Zudem zeigte sich hier auch keine Korrelation zwischen mRNA-Spiegeln und der Proteinexpression, sodass auf die mögliche Relevanz posttranslationaler Mechanismen hingewiesen wurde (118). Von einer anderen Arbeitsgruppe konnte ebenfalls gezeigt werden, dass TNFR1 bei Patienten mit juvenilem SLE im Vergleich zu Gesunden vermehrt exprimiert wird, wobei hier nur bei Patienten mit aktiver Lupusnephritis statistisch signifikante Unterschiede beobachtet werden konnten (200). Dass bei SLE-Patienten erhöhte TNF α -Spiegel festgestellt wurden, und TNF α die B-Zell-Proliferation und Antikörperproduktion stimulieren

kann, wurde bereits erwähnt (46, 120–122, 124). In einer Studie konnte nach Hinzugabe von TNF α zu CD19+ B-Zellen zudem keine vermehrte Apoptoserate festgestellt werden (201). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation mit TNF α in B-Zellen dazu führt, dass die TNFR1- und TNFR2-Expression erhöht wird, während sie beispielsweise durch den TNF α -Blocker Etanercept herunterreguliert werden kann (120). In einer Studie an Mäusen konnte gezeigt werden, dass Autoantikörper von SLE-Patienten mit TNFR1 interagieren und proapoptotisch wirken können (202), was möglicherweise über die vermehrte Entstehung von Autoantigenen auch die Krankheitsentstehung fördern kann. Es haben sich bisher nur wenige Studien mit der TNFR1-Expression auf B-Zellen bei SLE-Patienten befasst, insgesamt scheint hier jedoch eine erhöhte TNFR1-Expression mit der Studienlage übereinzustimmen und aufgrund seiner Assoziation mit der Proliferation und IgG-Produktion durch B-Zellen sowie seiner proapoptotischen Funktionen auf eine pathogene Rolle des Rezeptors im Zusammenhang mit SLE hinzudeuten (118, 121, 122, 124, 125, 202, 203). In älteren Bevölkerungsgruppen wurde eine erhöhte Expression von TNFR1 bei verminderter TNFR2-Expression auf T-Lymphozyten beobachtet, was hier jedoch mit einer Anfälligkeit für Apoptose verbunden war (204). Im Mausmodell zeigte sich bei experimenteller Autoimmunenzephalitis TNFR1 auch auf T_{reg} erhöht (110). Wie bereits erwähnt, konnte in dieser Studie auch gezeigt werden, dass TNFR1 die Differenzierung proinflammatorischer T-Zellen fördert, während TNFR2 der T_{reg}-Differenzierung dient (110). Im Zusammenhang mit B_{reg} wären ähnliche Mechanismen zu vermuten. Wir konnten zwar aufgrund der geringen Anzahl an B_{reg} eine erhöhte TNFR1-Expression nur auf Gesamt-B-Zellen untersuchen und nachweisen, eine leicht erhöhte Expression auf B_{reg} wäre jedoch denkbar, wobei hier dann möglicherweise proapoptotische Signale überwiegen könnten. Medikamente, die den TNF α -Signalweg blockieren, sind im Rahmen von Autoimmunerkrankungen von Bedeutung (117). Allerdings sind die Ergebnisse bei SLE hierzu kontrovers (108, 205, 206). Während insgesamt positive Effekte einer Anti-TNF α -Therapie beobachtet werden konnten, wurde auch die Entstehung SLE-ähnlicher Syndrome nach Therapie mit TNF α -Blockern beschrieben (108, 206). Ein möglicher Grund für die beschriebene Problematik könnte darin bestehen, dass durch eine solche Therapie der Signalweg beider Rezeptoren blockiert wird (205). Hier wären selektive Anti-TNFR1-Antagonisten, wie sie beispielsweise an Mäusen mit kollageninduzierter Arthritis beschrieben wurden (207), möglicherweise auch bei SLE von Interesse.

4.5 Die Expression des A3-Rezeptors zeigt sich auf B-Zellen von SLE-Patienten erhöht

Dass der A3-Rezeptor generell auf B-Zellen exprimiert wird, konnte in einigen Studien gezeigt werden (40, 144). Zudem zeigte sich in verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie COPD, rheumatoider Arthritis, Psoriasis, Colitis ulcerosa und Morbus Crohn eine erhöhte Expression des A3R (128, 136, 155, 208–210). So wurde beispielsweise in einer Studie an COPD-Patienten in Zellen des Lungenparenchyms eine vermehrte A3R-mRNA-Expression im Vergleich zu gesunden Probanden beobachtet (209). Die Arbeitsgruppe Varani et al. konnte auf Lymphozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis ebenfalls eine Erhöhung von A3R feststellen, und darüber hinaus zeigen, dass eine Aktivierung über einen A3R-Agonisten zu einer herabgesetzten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine führt (155). Ähnliche Ergebnisse konnte die Arbeitsgruppe Ravani et al. erzielen, die ebenso an Lymphozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis eine vermehrte A3R-mRNA-Expression messen konnte (210). Zudem konnte auch in dieser Studie durch die Hinzugabe eines A3R-Agonisten eine verminderte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, wie TNF α und IL-6 erreicht werden (210). Hingegen wurden in einer einzelnen an Lymphozyten von 80 SLE-Patienten durchgeführten Studie zwar eine erhöhte A2AR-mRNA-Expression, jedoch kein Unterschied in der A3R-mRNA-Expression festgestellt (144). An B-Zellen von SLE-Patienten durchgeführte Untersuchungen des A3R wurden bisher nach jetzigem Kenntnisstand nicht durchgeführt. Erste Hinweise auf Unterschiede zwischen SLE-Patienten und gesunden Probanden lagen aus unserer eigenen Arbeitsgruppe vor. Wir konnten eine statistisch signifikant erhöhte mRNA-Expression des A3R auf B-Zellen von SLE-Patienten feststellen. Diese Ergebnisse zeigen sich mit den oben genannten in unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen durchgeführten Studien übereinstimmend, weichen jedoch von den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Bortoluzzi et al. ab, wobei hier die Lymphozyten betrachtet wurden ohne zwischen B- und T-Zellen zu differenzieren (144). Die mögliche klinische Relevanz des A3R bei SLE wird bei Betrachtung der in verschiedenen Studien beschriebenen antiinflammatorischen Effekte von A3R-Agonisten deutlich (136, 150, 153–155, 164–166, 209, 210). Sowohl in Studien am Mausmodell als auch in Studien am Menschen konnte eine verminderte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie u. a. IFN γ , TNF α , IL-1 und IL-6, sowie eine Verbesserung der Symptomatik in unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen über Stimulation von A3R erreicht werden (153–155, 164, 166, 210). Zudem wurden in Patienten mit rheumatoider Arthritis bereits Phase II-Studien für einen A3R-Agonisten durchgeführt, die eine Verbesserung der klinischen Symptomatik bei insgesamt gut tolerierter Therapie beobachten

konnten (150, 165). Wir konnten in dieser Arbeit, wie auch bei Patienten mit rheumatoider Arthritis beschrieben, eine erhöhte A3R-Expression beobachten, sodass eine therapeutische Relevanz auch im systemischen Lupus Erythematoses denkbar wäre.

4.6 Effekte von B-Zellen auf T-Zellen bei SLE-Patienten möglicherweise vermindert

Vor der Anwendung der A3R-Agonisten und -Antagonisten betrachteten wir zunächst das proliferative Verhalten von T- und B-Zellen mit und ohne Hinzugabe von CpG als Induktor für B_{reg}. Hierbei ließen sich zwar keine statistisch signifikanten Unterschiede feststellen, wir konnten aber beobachten, dass T-Zellen von SLE-Patienten in der von uns betrachteten Patientenpopulation in Kulturen ohne Hinzugabe von B-Zellen tendenziell eine leicht verminderte Proliferationsrate zeigen. Ein geringeres proliferatives Verhalten von T-Zellen bei SLE-Patienten könnte hier eine Überlegung sein. Zuvor wurden jedoch, abgesehen von einer Studie, die in einer kleinen T-Zell-Untergruppe eine erhöhte Apoptoserate und verminderte proliferative Aktivität feststellen konnte, ähnliche Proliferationsraten zwischen T-Zellen von SLE-Patienten und Gesunden beobachtet (211, 212).

In den vorherigen Abschnitten wurde besprochen, dass in der in dieser Arbeit untersuchten Population regulatorische B-Zellen bei SLE-Patienten in ihrer Anzahl im Vergleich zu gesunden Probanden vermindert waren, und B-Zellen von SLE-Patienten eine verminderte Fähigkeit zur Produktion von IL-35 haben, sodass wir bei Durchführung der Versuche bei gesunden Probanden im Vergleich zu SLE-Patienten einen tendenziell stärkeren hemmenden Effekt von B-Zellen auf die T-Zell-Proliferation erwarteten. Insgesamt ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zeigen, was möglicherweise durch geringe Patientenzahlen, niedrige B-Zell-Zahlen und hohe Varianzen zu begründen ist. Tendenziell konnten wir bei Hinzugabe der autologen B-Zellen bei gesunden Probanden eine zunehmende T-Zell-Proliferation beobachten, während sich bei SLE-Patienten ähnliche Proliferationsraten wie bei Betrachtung der T-Zellen alleine zeigten und sogar ein tendenziell antiproliferativer Effekt der B Zellen zu sehen war. Diesbezüglich beobachteten andere Studien an Co-Kulturen ähnliche Resultate und konnten entweder ebenfalls eine vermehrte T-Zell-Proliferation oder keine Unterschiede bei Hinzugabe unstimulierter B-Zellen sehen (40, 213). Allerdings konnte die Arbeitsgruppe Gao et al. B_{reg} über andere Stimulanzen induzieren und hier inhibitorische Effekte auf T-Zellen beobachten, welche im Vergleich zu Gesunden vermindert waren (211).

Da die Vergleichbarkeit jedoch aufgrund der Unterschiede in der T-Zell-Proliferation erschwert war, verglichen wir Proben mit unterschiedlichen B-Zell-Konzentrationen miteinander und konnten hier bei höherer B-Zell-Konzentration bei Gesunden eine tendenziell abnehmende T-Zell Proliferation feststellen, während sie sich bei SLE-Patienten sogar tendenziell erhöht zeigte. Bei der Betrachtung der Effekte von mit CpG stimulierten B-Zellen konnte weiterhin ein geringer suppressiver Effekt bei gesunden Probanden beobachtet werden, welcher nun auch bei Proben von SLE-Patienten zu sehen war. Hierbei ist zu bedenken, dass die hier erwähnten Tendenzen aufgrund der geringen Patientenzahl und der starken Varianzen keine statistische Signifikanz erreichten und, wenn überhaupt vorhanden, äußerst gering waren, sodass möglicherweise auch die sehr geringe T-Zell-Zahl zu einer verminderten Messgenauigkeit der T-Zell-Proliferation geführt haben könnte. Zudem wiesen die Zellen von SLE-Patienten in allen Proben eine insgesamt tendenziell geringere Gesamtproliferation auf, was einen Vergleich der Effekte zusätzlich erschwerte.

Bezüglich der Stimulation von B-Zellen zur Entfaltung regulatorischer Effekte gibt es in der Literatur sehr unterschiedliche Meinungen. Es gibt beispielsweise Studien, die suggerieren, dass eine Aktivierung nur über TLR-9 (mittels CpG), nur über CD40 oder zusätzlich über den B-Zell-Rezeptor für die Stimulation regulatorischer Funktionen von B-Zellen notwendig sind, während in einer anderen Studie die zusätzliche Stimulation über den B-Zell-Rezeptor nicht wirksam war (17, 18, 24, 214). Zudem konnte in vielen Studien gezeigt werden, dass über eine Stimulation von B-Zellen mit CpG eine vermehrte Ausschüttung von IL-10 ausgelöst wird (13, 17, 169, 215). Durch die Arbeitsgruppe Blair et al. konnte zudem nach Aktivierung von SLE-B-Zellen über CD40 über eine anschließende Stimulation u. a. mit CpG eine Normalisierung der IL-10-Ausschüttung auf das Niveau von gesunden Probanden erreicht werden (21). Hingegen konnte in einer Studie von Sieber et al. gezeigt werden, dass B-Zellen von SLE-Patienten geringer auf eine TLR-9 Stimulation reagieren, als die von gesunden Probanden (216). Durch eine andere Arbeitsgruppe konnte über eine andere Art der B-Zell-Stimulation (über CD40 und IL-4) ein suppressiver Effekt von B-Zellen auf die T-Zell-Proliferation erreicht werden (40).

Wir konnten in dieser Arbeit bei SLE-Patienten insgesamt geringere Effekte von B-Zellen auf T-Zellen beobachten, wobei sich nach Stimulation der B-Zellen mit CpG sowohl bei Gesunden als auch bei SLE-Patienten ein insgesamt tendenziell geringer suppressiver Effekt bei erhöhter B-Zell-Zahl zeigen ließ, der jedoch nicht statistisch signifikant war, und von seiner Effektstärke ebenfalls kaum bedeutsam sein dürfte. Wir können

demnach in dieser Arbeit keine abschließende Aussage bezüglich der Aktivierung von B_{reg} mittels CpG tätigen.

4.7 Entgegengesetzte Wirkungen von A3R-Agonisten und -Antagonisten auf B-Zellen im Vergleich zwischen Gesunden und SLE-Patienten

Da wir in dieser Arbeit eine vermehrte Expression von A3R auf B-Zellen von SLE-Patienten nachweisen konnten und, wie bereits unter den Punkten 1.3.1 und 4.5 beschrieben, bereits durch mehrere Studien bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen eine immunregulatorische Wirkung von A3R-Agonisten beobachtet wurde, erwarteten wir zum einen eine Zunahme des antiproliferativen Effektes von B-Zellen auf T-Zellen und zum anderen einen stärkeren Effekt bei B-Zellen von SLE-Patienten.

Wir konnten in gesunden Probanden sowohl bei Hinzugabe des A3R-Agonisten als auch bei Hinzugabe des A3R-Antagonisten eine tendenzielle Zunahme der T-Zell-Proliferation beobachten, während sich bei SLE-Patienten mit beiden Substanzen ein eher suppressiver Effekt verzeichnen ließ. Statistisch signifikante Ergebnisse stellten wir hier allerdings nur bei Gesunden unter Betrachtung des prozentualen Anteils proliferierter Zellen in der Konzentration von 100 nM des Agonisten und in den Konzentrationen 100 nM und 200 nM des Antagonisten fest. Bei genauerer Betrachtung der Effektstärke sah man zudem, dass, im Vergleich zum A3R-Agonisten, eine stärkere Zunahme der T-Zell-Proliferation durch den A3R-Antagonisten bei gesunden Probanden erreicht werden konnte. Zudem ließ sich beobachten, dass die antiproliferative Wirkung der B-Zellen von SLE-Patienten zwar tendenziell verstärkt wurde, die Effektstärke jedoch insgesamt geringer war, als bei gesunden Probanden und hier keine statistisch signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden konnten.

Es stellt sich also die Frage, aus welchem Grund die A3R-Agonisten und -Antagonisten ähnliche tendenzielle Effekte aufweisen, während sie bei SLE-Patienten und Gesunden jeweils entgegengesetzt zu wirken scheinen. Bedenken muss man auch, dass bei SLE-Patienten keines der Ergebnisse statistisch signifikant war. Eine mögliche partielle Agonisten- oder Antagonistenfunktion der verwendeten Substanzen könnte zugrunde liegen. Allerdings wurde sowohl beim 2-Cl-IB-MECA als auch beim PSB 10 Hydrochlorid eine hohe Selektivität für A3-Rezeptoren, sowie eine starke Wirksamkeit festgestellt und auch vom Hersteller beschrieben, sodass dies als Ursache sehr unwahrscheinlich ist (40, 128, 151, 217). Zuvor sah man an Versuchen in Ratten, dass eine Behandlung mit A3R-Agonisten zu einer Herunterregulierung der A3R führen kann, sodass eine Be-

einflussung der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche oder anderer zellulärer Regulationsmechanismen durch Hinzugabe der Substanzen ebenfalls denkbar wäre, und so eine Interpretation der Ergebnisse zusätzlich erschweren könnte (153). Zu spekulieren wäre hier auch eine defekte Regulation der Rezeptordichte auf B-Zellen von SLE-Patienten, sodass es möglicherweise aufgrund der erhöhten Rezeptordichte im Vergleich zu Gesunden tatsächlich zu tendenziell suppressiven Effekten kommt, was jedoch den verstärkt suppressiven Effekt von A3R-Antagonisten im Vergleich zu den Agonisten nicht erklären würde, da zuvor in mehreren Studien antiinflammatorische Effekte von A3R-Agonisten beschrieben wurden (150, 156, 165, 166, 210). Alternativ könnte man auch Defekte im A3R selbst bei SLE-Patienten vermuten, was erklären würde, dass die stärkeren und statistisch signifikanten Effekte bei B-Zellen von gesunden Probanden festgestellt wurden, sodass die bei SLE-Patienten beobachteten Effekte möglicherweise durch andere Störfaktoren beeinflusst wurden. Allerdings konnte die Arbeitsgruppe Figueiró et al. unter Verwendung der gleichen Substanzen als A3R-Agonisten und -Antagonisten keine Unterschiede in der Proliferation von B-Zellen feststellen (39). Möglicherweise ist also, trotz der erhöhten Expression von A3R auf B-Zellen von SLE-Patienten, der Effekt auf B-Zellen generell zu gering, um Aussagen über die Beeinflussung des proliferativen Verhaltens der T-Zellen treffen zu können.

Als Kritikpunkt muss erwähnt werden, dass wir in dieser Arbeit die Zytokinausschüttung nach Aktivierung der Zellen nicht untersuchten. Zwar konnten wir in B-Zellen von SLE-Patienten eine vermehrte mRNA-Expression für IL-35 nachweisen, allerdings wird, wie bereits erwähnt, die Zytokinausschüttung durch verschiedene Aktivierungsmethoden unterschiedlich beeinflusst, und es kann sich ein von gesunden Zellen abweichendes Verhalten in den Zellen von SLE-Patienten zeigen (13, 14, 18, 21, 39, 102, 169, 216, 218). Unterschiede im Zytokin-Milieu nach Aktivierung der B- und T-Zellen könnten die Effekte folglich beeinflussen.

Eine erhöhte Apoptoserate von B-Zellen bei SLE-Patienten muss ebenfalls als Störfaktor in Erwägung gezogen werden, da diese im Rahmen dieser Arbeit nicht explizit untersucht wurde. Wir konnten zwar in allen Proben die für B-Zellen charakteristische Zellpopulation mittels Flowlogic als vital identifizieren, und es konnte in einer anderen Studie auch keine erhöhte Apoptoserate bei B-Zellen von SLE-Patienten nachgewiesen werden (211). Leichte Unterschiede zwischen Gesunden und Erkrankten im apoptotischen Verhalten der Zellen können jedoch nicht ausgeschlossen werden. Erwähnenswert ist außerdem die im Gating ausgeschlossene Population nicht mit *Cell Proliferation Dye eFluor 450* angefärbter vitaler Zellen (s. Abb. 7), die zwar zum Großteil CD4⁺ oder CD8⁺ Zellen beinhaltete, bei der jedoch eine Beurteilung des Proliferationsverhaltens nicht möglich war, sodass sie von der Auswertung ausgeschlossen

wurde. Da eine möglicherweise nicht vollständig reine B-Zell-Isolierung auch die Verhältnisse an B-Zellen zu T-Zellen beeinflussen kann, könnten sich Unterschiede in der Genauigkeit der Zellverhältnisse ebenfalls auf die beobachteten Effekte ausgewirkt haben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir in dieser Arbeit entgegen unserer Erwartungen, als einzige statistisch signifikante Ergebnisse sowohl über A3R-Agonisten als auch über A3R-Antagonisten keine suppressiven Effekte von B-Zellen auf T-Zellen bei gesunden Probanden auslösen konnten, wobei hier ein höherer proliferationsfördernder Effekt bei Anwendung der Antagonisten zu sehen war. Aufgrund geringer Patientenzahlen und Zellzahlen sowie sehr hoher Variabilität zwischen den verschiedenen SLE-Patienten und auch innerhalb von Doppelbestimmungen, ist eine abschließende Aussage durch diese Arbeit hierzu nicht möglich. Ein durch A3R-Agonisten ausgelöster antiproliferativer Effekt auf T-Zellen konnte nicht beobachtet werden.

4.8 Schlussfolgerung und Ausblick

Wir identifizierten in dieser Arbeit eine neue CD19+IgM+CD24+CD23-CD1d+CD5+ B-Zell-Population und konnten zeigen, dass diese und andere von uns untersuchte B_{reg}-Populationen bei SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden in ihrer Anzahl vermindert sind, was möglicherweise eine Rolle in der Pathophysiologie der Erkrankung spielen könnte.

Wir konnten außerdem beobachten, dass auf den untersuchten B-Zell-Populationen der Oberflächenmarker CD11c exprimiert wird, der im Allgemeinen eher mit einer vermehrten Antikörperproduktion assoziiert ist (49–52), und dass dieser bei SLE-Patienten auf B_{reg} vermehrt vorzufinden ist. Die darüber hinaus beobachtete verminderte IL-35 mRNA-Expression in B-Zellen von SLE-Patienten bestärkt zusätzlich die These, dass die immunregulatorische Funktion dieser Zellen im SLE beeinträchtigt ist. Während sich bei TGF- β 1, IL-10 und IL-21R keine Unterschiede feststellen ließen, exprimierten B-Zellen von SLE-Patienten, übereinstimmend mit der aktuellen Studienlage, vermehrt TNFR1. Dieser könnte aufgrund seiner Assoziation mit Proliferation und Antikörperproduktion bei B-Zellen (118, 121, 122, 124, 125, 202, 203) eine tendenziell proinflammatorische Rolle von B-Zellen fördern, und könnte daher möglicherweise, bei selektiver Blockade, eine Therapieoption darstellen (207).

Aufgrund der in dieser Arbeit nachgewiesenen erhöhten mRNA-Expression von A3R in B-Zellen von SLE-Patienten, sowie der in mehreren Autoimmunerkrankungen beschriebenen immunregulatorischen Funktion von A3R-Agonisten (136, 150, 153–155, 164–

166, 209, 210), erwarteten wir ähnliche Effekte in unserer Arbeit. Zumindest aber gingen wir von einem verstärkten Effekt der A3R-Agonisten und -Antagonisten auf B-Zellen von SLE-Patienten aus. Entgegen unserer Erwartungen konnten wir statistisch signifikante Effekte nur bei gesunden Probanden beobachten. Obwohl wir suppressive Effekte für die Agonisten und stimulierende Effekte für die Antagonisten erwarteten, konnte nach Einsatz beider Substanzen ein tendenziell proliferationsfördernder Effekt verzeichnet werden, der jedoch bei A3R-Antagonisten etwas deutlicher war. Hingegen konnte bei SLE-Patienten ein geringerer und nicht statistisch signifikanter Effekt verzeichnet werden. Man könnte hier einen möglicherweise vorhandenen Defekt des A3R-Signalweges mutmaßen. Aufgrund der geringen Patientenzahl und starker Variabilität innerhalb der SLE-Population sowie der unzureichenden Studienlage ist eine abschließende Schlussfolgerung diesbezüglich aber nicht möglich. Diese Ansätze lassen jedoch auf weitere Studien zu A3R-Agonisten im Zusammenhang mit SLE hoffen.

5 Literaturverzeichnis

1. Suttorp N, Möckel M, Siegmund B, Dietel M, editors. *Harrisons Innere Medizin*. 19. Auflage, deutsche Ausgabe. [New York], Berlin, [Stuttgart], [New York], Berlin, [Stuttgart]: McGraw-Hill Education; ABW Wissenschaftsverlag; Thieme; 2016. (Mc Graw Hill Education).
2. Marianthi Kiriakidou, Cathy Lee Ching. *Systemic Lupus Erythematosus*. *Annals of internal medicine* 2020.
3. Harvey PR, Gordon C. B-cell targeted therapies in systemic lupus erythematosus: Successes and challenges. *BioDrugs* 2013; 27(2):85–95.
4. Flavius Martin, Andrew C. Chan. Pathogenic roles of B cells in human autoimmunity; insights from the clinic. *Immunity* 2004; 2004(20):517–27.
5. D. Zucchi, E. Elefante, D. Schilirò, V. Signorini, F. Trentin, A. Bortoluzzi, C. Tani. One year in review 2022. systemic lupus erythematosus. *Clinical and experimental rheumatology*; 2022.
6. Murphy KM, Weaver C. *Janeway Immunologie*. 9. Auflage. Berlin: Springer Spektrum; 2018. (Springer Lehrbuch). Available from: URL: <http://www.springer.com/>.
7. Aringer M, Schneider M. Systemischer Lupus erythematosus. *Hautarzt* 2021; 72(4):337–48.
8. Antonis Fanouriakis, Myrto Kostopoulou, Alessia Alunno, Martin Aringer, Ingeborg Bajema, John N Boletis, Ricard Cervera, Andrea Doria, Caroline Gordon, Marcello Govoni, Frédéric Houssiau, David Jayne, Marios Kouloumas, Annegret Kuhn, Janni L Larsen, Kirsten Lerstrøm, Gabriella Moroni, Marta Mosca, Matthias Schneider, Josef S Smolen, Elisabet Svenungsson, Vladimir Tesar, Angela Tincani, Anne Troldborg, Ronald van Vollenhoven, Jörg Wenzel, George Bertsias, Dimitrios T Boumpas. 2019 update of the EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus 2019; 2019:736–45.
9. Martin Aringer MS. Systemischer Lupus erythematosus. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 2016; 2016:537–43.
10. Rink L, Kruse A, Haase H. *Immunologie für Einsteiger*. 2., neu bearbeitete und aktualisierte Auflage. Berlin: Springer Spektrum; 2015. (Lehrbuch).
11. Tretter T, Lorenz H-M. Regulatorische B-Zellen und ihre funktion im erhalt der peripheren toleranz. *Z Rheumatol* 2010; 69(9):813–7.

12. Ray A, Basu S, Williams CB, Salzman NH, Dittel BN. A novel IL-10-independent regulatory role for B cells in suppressing autoimmunity by maintenance of regulatory T cells via GITR ligand. *J Immunol* 2012; 188(7):3188–98.
13. Matsumoto M, Baba A, Yokota T, Nishikawa H, Ohkawa Y, Kayama H et al. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity* 2014; 41(6):1040–51.
14. Jansen K, Cevhertas L, Ma S, Satitsuksanoa P, Akdis M, van de Veen W. Regulatory B cells, A to Z. *Allergy* 2021; 76(9):2699–715.
15. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: Origin, phenotype, and function. *Immunity* 2015; 42(4):607–12.
16. Ji-Yang Wang, editor. *B Cells in Immunity and Tolerance*; 2020.
17. Glass MC, Glass DR, Oliveria J-P, Mbiribindi B, Esquivel CO, Krams SM et al. Human IL-10-producing B cells have diverse states that are induced from multiple B cell subsets. *Cell Rep* 2022; 39(3):110728.
18. Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol* 2012; 30:221–41.
19. Floudas A, Amu S, Fallon PG. New Insights into IL-10 Dependent and IL-10 Independent Mechanisms of Regulatory B Cell Immune Suppression. *J Clin Immunol* 2016; 36 Suppl 1:25–33.
20. Yanaba K, Bouaziz J-D, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity* 2008; 28(5):639–50.
21. Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR et al. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity* 2010; 32(1):129–40.
22. David J. DiLillo, Takashi Matsushita, and Thomas F. Tedder. B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2010:38–57.
23. Diego Catalán, Miguel Andrés Mansilla, Ashley Ferrier, Lilian Soto, Kristine Oleinika, Juan Carlos Aguillon, Octavio Aravena. Immunosuppressive Mechanisms of Regulatory B Cells. *frontiers in Immunology* 2021:1–30.

24. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, DiLillo DJ, Yanaba K, Venturi GM et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* 2011; 117(2):530–41.
25. Ioannis Kalampokis, Ayumi Yoshizaki and Thomas F Tedder. IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease. *Arthritis Research & Therapy* 2013; (15(Suppl 1)).
26. Yanaba K, Bouaziz J-D, Matsushita T, Tsubata T, Tedder TF. The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *J Immunol* 2009; 182(12):7459–72.
27. Mauri C, Gray D, Mushtaq N, Londei M. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med* 2003; 197(4):489–501.
28. Fillatreau S, Sweenie CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* 2002; 3(10):944–50.
29. Jean-David Bouaziz, Koichi Yanaba, Thomas F. Tedder. Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. *Immunological Reviews* 2008; (224):201–14.
30. Kenneth A Newell, Adam Asare, Allan D Kirk, Trang D Gisler, Kasia Bourcier, Manikkam Suthanthiran, William J Burlingham, William H Marks, Ignacio Sanz, Robert I Lechler, Maria P Hernandez-Fuentes, Laurence A Turka, Vicki L Seyfert-Margolis. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *The journal of clinical investigation* 2010; (120).
31. Md Rezaul Karim, Yun-Fu Wang. Phenotypic identification of CD19+CD5+CD1d+ regulatory B cells that produce interleukin 10 and transforming growth factor β 1 in human peripheral blood. *Basic research* 2018.
32. Magdalena Hagn, Elisabeth Schwesinger, Verena Ebel, Kai Sontheimer, Julia Maier, Thamara Beyer, Tatiana Syrovets, Yves Laumonnier, Dorit Fabricius, Thomas Simmet and Bernd Jahrsdörfer. Human B cells secrete granzyme B when recognizing viral antigens in the context of the acute phase cytokine IL-21. *The Journal of Immunology* 2009; 2009(183):1838–45.
33. Suzan M. Salti*, Erin M. Hammelev*, Jenny L. Grewal*, Sreelatha T. Reddy*, Sara Zemple*, William J. Grossman†, Mitchell H. Grayson*, and James W. Verbsky*. Granzyme B regulates antiviral CD8+ T cell responses. *Journal of immunology* 2011; 2011.

34. Lindner S, Dahlke K, Sontheimer K, Hagn M, Kaltenmeier C, Barth TFE et al. Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells. *Cancer Res* 2013; 73(8):2468–79.
35. Yoshizaki A, Miyagaki T, DiLillo DJ, Matsushita T, Horikawa M, Kountikov EI et al. Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature* 2012; 491(7423):264–8.
36. Chien-Hui Chien, Bor-Luen Chiang. Recent advances in regulatory T cells induced by B cells. *Cellular and Molecular Immunology* 2017.
37. Wang R-X, Yu C-R, Dambuza IM, Mahdi RM, Dolinska MB, Sergeev YV et al. Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nat Med* 2014; 20(6):633–41.
38. Shen P, Roch T, Lampropoulou V, O'Connor RA, Stervbo U, Hilgenberg E et al. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* 2014; 507(7492):366–70.
39. Figueiró F, Muller L, Funk S, Jackson EK, Battastini AMO, Whiteside TL. Phenotypic and functional characteristics of CD39^{high} human regulatory B cells (Breg). *Oncoimmunology* 2016; 5(2):e1082703.
40. 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.
41. Silvia Deaglio,¹ Karen M. Dwyer,¹ Wenda Gao,¹ David Friedman,¹ Anny Usheva,¹ Anna Erat,¹ Jiang-Fan Chen,³ Keiichii Enjyoji,¹ Joel Linden,⁴ Mohamed Oukka,⁵ Vijay K. Kuchroo,⁵ Terry B. Strom,^{1,2} and Simon C. Robson¹. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 2007; 2007:1257–65.
42. Yang X, Yang J, Chu Y, Xue Y, Xuan D, Zheng S et al. T follicular helper cells and regulatory B cells dynamics in systemic lupus erythematosus. *PLoS ONE* 2014; 9(2):e88441.
43. Tao Wang, Zhijun Li, Xingfu Li, Linjie Chen, Hao Zhao, Chao Jiang, Lijun Song. Expression of CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} B cells, IL-10 and IL-10R in peripheral blood from patients with systemic lupus erythematosus. *Molecular Medicine Reports* 2017; 2017.

44. K. Heinemann, B Wilde, A Hoerning, B Tebbe, A Kribben, O Witzke & S Dolff. Decreased IL-10+ regulatory B cells (Bregs) in lupus nephritis patients. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 2016; 2016.
45. Li Wang, Pingwei Zhao, Liang Ma, Yuxing Shan, Juan Wang, Yanfang Jiang and Zhenyu Jiang. Increased interleukin 21 and follicular helper T-like cells and reduced interleukin 10+ B cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology* 2014; 2014.
46. Zhuang Ye, Yanfang Jiang, Dejun Sun, Wei Zhong, Ling Zhao, Zhenyu Jiang. The Plasma Interleukin (IL)-35 Level and Frequency of Circulating IL-35+ Regulatory B Cells are Decreased in a Cohort of Chinese Patients with New-onset Systemic Lupus Erythematosus. *nature research* 2019.
47. Hou L, Voit RA, Sankaran VG, Springer TA, Yuki K. CD11c regulates hematopoietic stem and progenitor cells under stress. *Blood Adv* 2020; 4(24):6086–97.
48. Karnell JL, Kumar V, Wang J, Wang S, Voynova E, Ettinger R. Role of CD11c+ T-bet+ B cells in human health and disease. *Cell Immunol* 2017; 321:40–5.
49. Liu Y, Zhou S, Qian J, Wang Y, Yu X, Dai D et al. T-bet+CD11c+ B cells are critical for antichromatin immunoglobulin G production in the development of lupus. *Arthritis Research & Therapy* 2017; 19(1):225.
50. Wang S, Wang J, Kumar V, Karnell JL, Naiman B, Gross PS et al. IL-21 drives expansion and plasma cell differentiation of autoreactive CD11c+T-bet+ B cells in SLE. *Nat Commun* 2018; 9(1):1–14.
51. Marie-Laure Golinski, Mélanie Demeules, Céline Derambure, Gaetan Riou, Maud Maho-Vaillant, Olivier Boyer, Pascal Joly, Sébastien Calbo. CD11c+ B Cells Are Mainly Memory Cells, Precursors of Antibody Secreting Cells in Healthy Donors. *frontiers in Immunology* 2020; 2020.
52. Anatoly V. Rubtsov, Kira Rubtsova, Aryeh Fischer, Richard T. Meehan, Joann Z. Gillis, John W. Kappler, Philippa Marrack. Toll-like receptor 7 (TLR7)–driven accumulation of a novel CD11c+ B-cell population is important for the development of autoimmunity. *Blood* 2011; (118):1305–15.
53. Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K et al. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; 21(5):331–44.
54. Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol Rev* 2003; 55(2):241–69.

55. Kevin W. Moore, Rene de Waal Malefyt, Robert L. Coffman, and Anne O'Garra. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 2001.
56. Xiaoting Wang, Kit Wong, Wenjun Ouyang, Sascha Rutz. Targeting IL-10 Family Cytokines for the Treatment of Human Diseases. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2019; 2019.
57. Swayanka Biswas, Katja Bieber and Rudolf Armin Manz. IL-10 revisited in systemic lupus erythematosus. *frontiers in Immunology* 2022; 68:1–6.
58. Hervé Groux, Mike Bigler, Jan E. deVries, Maria-Grazia Roncarolo. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med* 1996.
59. David F. Fiorentino, Martha W. Bond, Tim R. Mosmann. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *journal of experimental medicine* 1989.
60. Waal Malefyt R de, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991; 174(4):915–24.
61. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *Journal of immunology* 1991; (11):3815–22.
62. Ding-Lei Su, Zhi-Min Lu, Min-Ning Shen, Xia Li, Ling-Yun Sun. Roles of Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of SLE. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012.
63. D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med* 1993; 1993.
64. Natalie A Carter, Elizabeth C Rosser and Claudia Mauri. Interleukin-10 produced by B cells is crucial for the suppression of Th17, Th1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and reduction of collagen-induced arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2012; 2012.

65. Schuetze N, Schoeneberger S, Mueller U, Freudenberg MA, Alber G, Straubinger RK. IL-12 family members: differential kinetics of their TLR4-mediated induction by *Salmonella enteritidis* and the impact of IL-10 in bone marrow-derived macrophages. *Int Immunol* 2005; 17(5):649–59.
66. Collison LW, Chaturvedi V, Henderson AL, Giacomini PR, Guy C, Bankoti J et al. IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat Immunol* 2010; 11(12):1093–101.
67. Wei X, Zhang J, Gu Q, Huang M, Zhang W, Guo J et al. Reciprocal Expression of IL-35 and IL-10 Defines Two Distinct Effector Treg Subsets that Are Required for Maintenance of Immune Tolerance. *Cell Rep* 2017; 21(7):1853–69.
68. Luis Llorente, Weiping Zou, Yves Levy, Yvonne Richaud-Patin, John Wijdenes, Jorge Alcocer-Varela, Brigitte Morel-Fourrier, Jean-Claude Brouet, Donato Alarcon-Segovia, Pierre Galanaud, and Dominique Emile. Role of interleukin 10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus. *Journal of experimental medicine* 1995.
69. F Rousset, E Garcia, T Defrance, C Péronne, N Vezzio, D H Hsu, R Kastelein, K W Moore, J Banchereau. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Immunology* 1992; 1992.
70. R. Kühn, J. Löhler, D. Rennick, K. Rajewsky, W. Müller. IL-10 defiziente Mäuse entwickeln inflammatorische Darmerkrankungen. *Cell* 1993.
71. Ankit Saxena, Sam Khosraviani, Sanjeev Noel, Divya Mohan, Thomas Donner, and Abdel Rahim A. Hamad. Interleukin-10 paradox A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. *Cytokine* 2014; 2014.
72. R Undeutsch, J Y Humrich, Papendieck, G Riemekasten. CD4 T cells producing IL-10 have a beneficial effect in murine lupus. *Ann Rheum Dis* 2011; 2011.
73. Blenman KRM, Duan B, Xu Z, Wan S, Atkinson MA, Flotte TR et al. IL-10 regulation of lupus in the NZM2410 murine model. *Lab Invest* 2006; 86(11):1136–48.
74. Agnieszka Winikajtis-Burzyńska, Marek Brzosko and Hanna Przepiera-Będzak. Increased Serum Interleukin 10 Levels Are Associated with Increased Disease Activity and Increased Risk of Anti-SS-A/Ro Antibody Positivity in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Biomolecules* 2023; 2023.

75. Park YB, Lee SK, Kim DS, Lee J, Lee CH, Song CH. Elevated interleukin-10 levels correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clinical and experimental rheumatology* 1998; 16(3):283–8.
76. Metawie SA, ElRefai RM, ElAde SS, Shahin RMH. Transforming growth factor- β 1 in systemic lupus erythematosus patients and its relation to organ damage and disease activity. *The Egyptian Rheumatologist* 2015; 37(4):S49-S54.
77. T Jin, K Almedhed, H Carlsten and H Forsblad-d'Elia. Decreased serum levels of TGF- β 1 are associated with renal damage in female patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2012.
78. Fuensanta Gómez-Bernal, Juan Carlos Quevedo-Abeledo, María García-González, Yolanda Fernández-Cladera, Agustín F. González-Rivero, Antonia de Vera-González et al. Serum Levels of Transforming Growth Factor Beta 1 in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Biomolecules* 2022.
79. Masato Morikawa, Rik Derynck, and Kohei Miyazono. TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2016.
80. Marcia M. Shull, Ilona Ormsby, Ann B. Kier, Sharon Pawlowskr, Ronald J. Diebold, Moying Yin, Ruth Allen, Charles Sidman*, Gabriele Proetzel, Dawn Calvint, Nikki Annunziata, and Thomas Doetschman. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992.
81. Travis MA, Sheppard D. TGF- β activation and function in immunity. *Annu Rev Immunol* 2014; 32:51–82.
82. Jian H, Shen X, Liu I, Semenov M, He X, Wang X-F. Smad3-dependent nuclear translocation of beta-catenin is required for TGF-beta1-induced proliferation of bone marrow-derived adult human mesenchymal stem cells. *Genes Dev* 2006; 20(6):666–74.
83. Russell WE, Coffey RJ, JR, Ouellette AJ, Moses HL. Type beta transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(14):5126–30.
84. R. Govinden KB. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor- β . *Pharmacology & Therapeutics* 2003.
85. Asma Elbeldi-Ferchiou & Mélika Ben Ahmed & Monia Smiti-Khanfir & Mohamed Habib Houman & Maha Abdeladhim & Nadia Belhadj Hmida & Nadine Cerf-Bensussan

& Hechmi Louzir. Resistance to exogenous TGF- β effects in patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol* 2011.

86. Vijay Saxena, Douglas W. Lienesch, Min Zhou Ramireddy Bommireddy, Mohamad Azhar, Thomas Doetschman, Ram Raj Singh. Dual Roles of Immunoregulatory Cytokine TGF- β in the Pathogenesis of Autoimmunity-Mediated Organ Damage. *Journal of immunology* 2008.

87. J H Kehrl, L M Wakefield, A B Roberts, S Jakowlew, M Alvarez-Mon, R Derynck, M B Sporn, A S Fauci. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *journal of experimental medicine* 1986.

88. McCarron MJ, Marie JC. TGF- β prevents T follicular helper cell accumulation and B cell autoreactivity. *The journal of clinical investigation* 2014; 124(10):4375–86.

89. Yasmina Laouar, Fayyaz S Sutterwala, Leonid Gorelik & Richard A Flavell. Transforming growth factor- β controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon- γ . *Nat Immunol* 2005.

90. Rajalakshmy Ramalingam, Claire B Larmonier, Robert D Thurston, Monica T Midura-Kiela, Song Guo Zheng, Fayez K Ghishan, Pawel R Kiela. Dendritic cell-specific disruption of TGF- β receptor II leads to altered regulatory T cell phenotype and spontaneous multiorgan autoimmunity. *Journal of immunology* 2012.

91. Roberto Tinoco, Victor Alcalde, Yating Yang, Karsten Sauer, and Elina I Zuniga. TGF- β Signaling in T cells is Essential for CD8 T Cell Suppression and Viral Persistence In Vivo. *Immunity* 2009.

92. WanJun Chen, Wenwen Jin, Neil Hardegen, Ke-jian Lei, Li Li, Nancy Marinos, George McGrady, and Sharon M. Wahl. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003.

93. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; 441(7090):235–8.

94. Thomas Korn, Estelle Bettelli, Wenda Gao, Amit Awasthi, Anneli Jäger, Terry B. Strom, Mohamed Oukka, and Vijay K. Kuchroo. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 2007.

95. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 2007; 450(7169):566–9.
96. Sergio Haller Anaïs Duval Romain Migliorini Mathias Stevanin Vanessa Mack, Hans Acha-Orbea. Interleukin-35-Producing CD8 α ⁺ Dendritic Cells Acquire a Tolerogenic State and Regulate T Cell Function. *frontiers in Immunology* 2017; (8).
97. Bettini M, Castellaw AH, Lennon GP, Burton AR, Vignali DAA. Prevention of autoimmune diabetes by ectopic pancreatic β -cell expression of interleukin-35. *Diabetes* 2012; 61(6):1519–26.
98. Tedder TF, Leonard WJ. Autoimmunity: Regulatory B cells--IL-35 and IL-21 regulate the regulators. *Nat Rev Rheumatol* 2014; 10(8):452–3.
99. Li X, Mai J, Virtue A, Yin Y, Gong R, Sha X et al. IL-35 is a novel responsive anti-inflammatory cytokine--a new system of categorizing anti-inflammatory cytokines. *PLoS ONE* 2012; 7(3):e33628.
100. Ettinger R, Kuchen S, Lipsky PE. The role of IL-21 in regulating B-cell function in health and disease. *Immunol Rev* 2008; 223:60–86.
101. Stuart G. Tangye and Cindy S. Ma. Regulation of the germinal center and humoral Immunity by IL-21. *journal of experimental medicine* 2020; 2020:1–13.
102. J Parrish-Novak, S R Dillon, A Nelson, A Hammond, C Sprecher, J A Gross, J Johnston, K Madden, W Xu, J West, S Schrader, S Burkhead, M Heipel, C Brandt, J L Kuijper, J Kramer, D Conklin, S R Presnell, J Berry, F Shiota, S Bort, K Hambly, S Mudri, C Clegg, M Moore, F J Grant, C Lofton-Day, T Gilbert, F Rayond, A Ching, L Yao, D Smith, P Webster, T Whitmore, M Maurer, K Kaushansky, R D Holly, D Foster. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 2000; (408):57–63.
103. Lucinda J. Berglund, Danielle T. Avery, Cindy S. Ma, Leen Moens, Elissa K. Deenick, Jacinta Bustamante, Stephanie Boisson-Dupuis, Melanie Wong, Stephen Adelstein, Peter D. Arkwright, Rosa Bacchetta, Liliana Bezrodnik, Harjit Dadi, Chaim Roifman, David A. Fulcher, John B. Ziegler, Joanne M. Smart, Masao Kobayashi, Capucine Picard, Anne Durandy, Matthew C. Cook, Jean-Laurent Casanova. IL-21 signalling via STAT3 primes human naïve B cells to respond to IL-2 to enhance their differentiation into plasmablasts. *Blood* 2013; 2013.
104. Rosanne Spolski and Warren J. Leonard. Interleukin-21: Basic Biology and Implications for Cancer and Autoimmunity*. *Annu Rev Immunol* 2008; 2008(26):57–79.

105. Ren HM, Lukacher AE, Rahman ZSM, Olsen NJ. New developments implicating IL-21 in autoimmune disease. *J Autoimmun* 2021; 122:1–12.
106. Spolski R, Leonard WJ. Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 2014; 13(5):379–95.
107. Di Long, Chen Y, Wu H, Zhao M, Lu Q. Clinical significance and immunobiology of IL-21 in autoimmunity. *J Autoimmun* 2019; 99:1–14.
108. Martin Aringer, Josef S Smolen. The role of tumor necrosis factor-alpha in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy* 2008; 2008.
109. Frasca D, Romero M, Diaz A, Alter-Wolf S, Ratliff M, Landin AM et al. A molecular mechanism for TNF- α -mediated downregulation of B cell responses. *J Immunol* 2012; 188(1):279–86.
110. Sujuan Yang, Chichu Xie, Ye Chen, Julie Wang, Xiaoqing Chen, Zhengqi Lu et al. Differential roles of TNF α - TNFR1 and TNF α --TNFR2 in the differentiation and function of CD4+Foxp3+ induced Treg cells in vitro and in vivo periphery in autoimmune diseases. *Cell Death and Disease* 2018.
111. George Kollias DK. Role of TNF/TNFR in autoimmunity: specific TNF receptor blockade may be advantageous to anti-TNF treatments. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002.
112. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 2008; 214(2):149–60.
113. Borghi A, Verstrepen L, Beyaert R. TRAF2 multitasking in TNF receptor-induced signaling to NF- κ B, MAP kinases and cell death. *Biochem Pharmacol* 2016; 116:1–10.
114. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 2003; 114(2):181–90.
115. Barnhart BC, Peter ME. The TNF receptor 1: A split personality complex. *Cell* 2003; 114(2):148–50.
116. Cabal-Hierro L, Lazo PS. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal* 2012; 24(6):1297–305.
117. van Hauwermeiren F, Vandenbroucke RE, Libert C. Treatment of TNF mediated diseases by selective inhibition of soluble TNF or TNFR1. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011; 22(5-6):311–9.

118. Lang-Jing Zhu, Carolina Landolt-Marticorena, Timothy Li, Xiao Yang, Xue-Qing Yu, Dafna D. Gladman, Murray B. Urowitz, Paul R. Fortin, Joan E. Wither. Altered expression of TNF-alpha signaling pathway proteins in systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology* 2010; (37):1658–66.
119. Jeong Ryeol Kim, Donghyuk Lee, Yerim Kim, Joo Young Kim. CD20/TNFR1 dual-targeting antibody enhances lysosome rupture-mediated cell death in B cell lymphoma. *Springer Nature, Cancer Immunology* 2022; 10.
120. Ling-Ling Zhang and Wei Wei. CP-25, a Novel Anti-inflammatory and Immunomodulatory Drug, Inhibits the Functions of Activated Human B Cells through Regulating BAFF and TNF-alpha Signaling and Comparative Efficacy with Biological Agents. *Frontiers in Pharmacology* 2017; 2017.
121. V A Boussiotis, L M Nadler, J L Strominger, and A E Goldfeld. Tumor necrosis factor alpha is an autocrine growth factor for normal human B cells. *Immunology* 1994.
122. P Rieckmann, F D'Alessandro, R P Nordan, A S Fauci, J H Kehrl. IL-6 and tumor necrosis factor-alpha. Autocrine and paracrine cytokines involved in B cell function. *The Journal of Immunology* 1991.
123. Robert C. Rickert, Julia Jellusova, Ana V. Miletic. Signaling by the TNFR superfamily in B-cell biology and disease. *Immunological Reviews* 2011; (244):115–33.
124. P. Rieckmann, J. M. Tuscano and J. H. Kehrl. Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) and Interleukin-6 (IL-6) in B-Lymphocyte Function. *Methods* 1997.
125. Farid Ghorbaninezhad, Patrizia Leone, Hajar Alemohammad, Basira Najafzadeh, Niloufar Sadat Nourbakhsh, Marcella Prete, Eleonora Malerba, Hossein Saeedi, Neda Jalili Tabrizi, Vito Racanelli, Behzad Baradaran. Tumor necrosis factor- α in systemic lupus erythematosus Structure, function and therapeutic implications (Review). *International Journal of Molecular Medicine* 2022.
126. Pier Giovanni Baraldi,† Mojgan Aghazadeh Tabrizi,† Stefania Gessi,‡ and Pier Andrea Borea‡. Adenosine receptor antagonists: translating medicinal chemistry and pharmacology into clinical utility. *Chemical Reviews* 2008; 2008.
127. Gunnar Schulte. Adenosin, Adenosinrezeptoren und adenosinrezeptoraktivierte Signalwege. *Biospektrium* 2004; (10):159–61.
128. Borea PA, Varani K, Vincenzi F, Baraldi PG, Tabrizi MA, Merighi S et al. The A3 adenosine receptor: history and perspectives. *Pharmacol Rev* 2015; 67(1):74–102.

129. Borea PA, Gessi S, Merighi S, Varani K. Adenosine as a Multi-Signalling Guardian Angel in Human Diseases: When, Where and How Does it Exert its Protective Effects? *Trends Pharmacol Sci* 2016; 37(6):419–34.
130. Haskó G, Cronstein B. Regulation of inflammation by adenosine. *frontiers in Immunology* 2013; 4:85.
131. Hussein Al-Qasim. Studien zur Synthese neuer 5,6-Dihydro-dipyrazolo[3,4-b:3',4'-d]pyridin-4(1H)-one mit potentieller biologischer Aktivität. Diplomarbeit Universität Wien.
132. Luca Antonioli^{1,2}, Pál Pacher³, E. Sylvester Vizi^{4,5}, and György Haskó². CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med*. 2013; 2013.
133. György Haskó, Joel Linden, Bruce Cronstein, Pál Pacher. Adenosine receptors. therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 2008(7):759–70.
134. 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.
135. Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783(5):673–94.
136. Pier Andrea Borea, Stefania Gessi, Stefania Merighi, Fabrizio Vincenzi, and Katia Varani. Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. *Physiology Rev*. 2018.
137. Ting Yang, Xiang Gao, Monica Sandberg, Christa Zollbrecht, Xing-Mei Zhang, Michael Hezel, Ming Liu, Maria Peleli, En-Yin Lai, Robert A Harris, A Erik G Persson, Bertil B Fredholm, Leif Jansson, Mattias Carlström. Abrogation of adenosine A1 receptor signalling improves metabolic regulation in mice by modulating oxidative stress and inflammatory. *Diabetologia*; 2015.
138. Peleli M, Carlstrom M. Adenosine signaling in diabetes mellitus and associated cardiovascular and renal complications. *Mol Aspects Med* 2017; 55:62–74.
139. Shigeki Tsutsui,¹ Jurgen Schnermann,³ Farshid Noorbakhsh,¹ Scot Henry,¹ V. Wee Yong,¹ Brent W. Winston,². A1 Adenosine Receptor Upregulation and Activation Attenuates Neuroinflammation and Demyelination in a Model of Multiple Sclerosis. *The Journal of Neuroscience* 2004; 2004.

140. Elisabeth Panther, Marco Idzko, Yared Herouy, Henriette Rheinen, Peter J. Gebicke-Haerter, Ulrich Mrowietz, Stefan Dichmann, Johannes Norgauer. Expression and function of adenosine receptors in human dendritic cells. *The FASEB Journal* 2001.
141. Gunnar Schulte, Bertil B. Fredholm. The G(s)-coupled adenosine A_{2B} receptor recruits divergent pathways to regulate ERK1/2 and p38. *Experimental cell Research* 290 2003.
142. M Sakowicz-Burkiewicz 1, K Kocbuch, M Grden, I Maciejewska, A Szutowicz, T Pawelczyk. Impact of adenosine receptors on immunoglobulin production by human peripheral blood B lymphocytes. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2012.
143. Emanuela Mazzon, Emanuela Esposito, Daniela Impellizzeri, Rosanna Di Paola, Alessia Melani, Placido Bramanti, Felicita Pedata, and Salvatore Cuzzocrea. CGS 21680, an Agonist of the Adenosine (A_{2A}) Receptor, Reduces Progression of Murine Type II Collagen-induced Arthritis. *The Journal of Rheumatology* 2011.
144. Bortoluzzi A, Vincenzi F, Govoni M, Padovan M, Ravani A, Borea PA et al. A_{2A} adenosine receptor upregulation correlates with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy* 2016; 18(1):192.
145. C M Aherne, B Saeedi, C B Collins, J C Masterson, E N McNamee, L Perrenoud et al. Epithelial-specific A_{2B} adenosine receptor signaling protects the colonic epithelial barrier during acute colitis. *Mucosal Immunology* 2015.
146. Vasantha L Kolachala¹, Matam Vijay-Kumar², Guillaume Dalmasso¹, Dan Yang⁴, Joel Linden³, Lixin Wang¹, Andrew Gewirtz², Katya Ravid⁴, Didier Merlin¹, and Shanathi V. Sitaraman¹. A_{2B} adenosine receptor gene deletion attenuates murine colitis. *Gastroenterology* 2008; 2008.
147. Kenneth A. Jacobson, Stefania Merighi, Katia Varani, Pier Andrea Borea, Stefania Baraldi, Mojgan Aghazadeh Tabrizi et al. A₃ Adenosine Receptors as Modulators of Inflammation: From Medicinal Chemistry to Therapy. *Med Res Rev.*; 2018.
148. Pnina Fishman,^{1,2} Sara Bar-Yehuda,¹ Lea Madi² and Ilan Cohn². A₃ adenosine receptor as a target for cancer therapy. *Anti-Cancer Drugs* 2002.
149. Timothy M. Palmer, Thomas W. Gettys, Gary L. Stiles. Differential interaction with and regulation of multiple G-proteins by the rat A₃ adenosine receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 1995.

150. Fishman P, Cohen S. The A3 adenosine receptor (A3AR): therapeutic target and predictive biological marker in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2016; 35(9):2359–62.
151. Stefania Gessi, Katia Varani, Stefania Merighi, Elena Cattabriga, Arianna Avitabile. Expression of A3 adenosine receptors in human lymphocytes up-regulation in T cell activation. *Molecular Pharmacology* 2003; 2003.
152. N Filippa, C L Sable, C Filloux, B Hemmings, E Van Obberghen. Mechanism of Protein Kinase B Activation by Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase. *Molecular and cellular biology* 1999.
153. Pnina Fishman, corresponding author^{1,2} Sara Bar-Yehuda,^{1,2} Lea Madi,¹ Lea Rath-Wolfson,³ Avivit Ochaion,¹ Shira Cohen,¹ and EHUD Baharav². The PI3K–NF- κ B signal transduction pathway is involved in mediating the anti-inflammatory effect of IB-MECA in adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2006; 2006.
154. Jung Yeon Lee, Bong Sook Jhun, Young Taek Oh, Ju Hie Lee, Wonchae Choe, Hyung Hwan Baik, Joohun Ha, Kyung-Sik Yoon, Sung Soo Kim, Insug Kang. Activation of adenosine A3 receptor suppresses lipopolysaccharide-induced TNF- α production through inhibition of PI 3-kinase/Akt and NF- κ B activation in murine BV2 microglial cells. *Neuroscience Letters* 2006; 2006.
155. Katia Varani, Melissa Padovan, Fabrizio Vincenzi, Martina Targa, Francesco Trotta, Marcello Govoni et al. A2A and A3 adenosine receptor expression in rheumatoid arthritis: upregulation, inverse correlation with disease activity score and suppression of inflammatory cytokine and metalloproteinase release. *Arthritis Research & Therapy*; 2011.
156. Young-Rae Lee, Suc-Hyun Kweon, Kang-Beom Kwon, Jin-Woo Park, Taek-Rim Yoon, Byung-Hyun Park. Inhibition of IL-1 β -mediated inflammatory responses by the I κ B α super-repressor in human fibroblast-like synoviocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008.
157. M P Abbracchio, R Brambilla, S Ceruti, H O Kim, D K von Lubitz, K A Jacobson, F Cattabeni. G protein-dependent activation of phospholipase C by adenosine A3 receptors in rat brain. *Mol Pharmacol.* 1995.
158. Ramkumar V, Stiles GL, Beaven MA, Ali H. The A3 adenosine receptor is the unique adenosine receptor which facilitates release of allergic mediators in mast cells. *Journal of Biological Chemistry* 1993; 268(23):16887–90.

159. Gunnar Schulte and Bertil B. Fredholm. Human Adenosine A1, A2A, A2B, and A3 Receptors Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells All Mediate the Phosphorylation of Extracellular-Regulated Kinase 1/2. *Molecular Pharmacology* 2000; 2000.
160. Rony Seger, Edwin G. Krebs. The MAPK signaling cascade. *Serial Review* 1995; 1995.
161. Stefania Gessi a, Stefania Merighi a, Katia Varani a, Edward Leung b, Stephen Mac Lennan b, Pier Andrea Borea. The A3 adenosine receptor: an enigmatic player in cell biology. *Pharmacology & Therapeutics* 2008; 2008.
162. Balázs Koscsó, Balázs Csóka, Pál Pacher, György Haskó. Investigational A3 adenosine receptor targeting agents. *Expert Opinion* 2011.
163. Yu Chen Ross Corriden, Yoshiaki Inoue, Linda Yip, Naoyuki Hashiguchi, p, y g Annelies Zinkernagel, Victor Nizet, Paul A Insel, Wolfgang G Junger. ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science* 2006; (314).
164. G Haskó 1, Z H Németh, E S Vizi, A L Salzman, C Szabó. An agonist of adenosine A receptors decreases interleukin-12 and 3 interferon-g production and prevents lethality in endotoxemic mice. *European journal of Pharmacology* 1998; 1998.
165. Yair Molad, Itzhak Rosner, Michael Rozenbaum, Reuven Mader, Muhamad Adawi, Dan Caspi, Michael H. Silverman, Vibeke Strand, Doron Markovits, Menachem Nahir, Tatiana Reitblat. Clinical Evidence for Utilization of the A3 Adenosine Receptor as a Target to Treat Rheumatoid Arthritis: Data from a Phase II Clinical Trial. *The Journal of Rheumatology* 2008; 2008.
166. Jon Mabley, Francisco Soriano, Pál Pacher, György Haskó, Anita Marton, Rebecca Wallace, Andrew Salzman, Csaba Szabó. The adenosine A3 receptor agonist, N6-(3-iodobenzyl)-adenosine-5'-N-methyluronamide, is protective in two murine models of colitis. *European journal of Pharmacology* 2003; 2003.
167. Mauri C, Blair PA. The incognito journey of a regulatory B cell. *Immunity* 2014; 41(6):878–80.
168. Ray A, Dittel BN. Mechanisms of Regulatory B cell Function in Autoimmune and Inflammatory Diseases beyond IL-10. *J Clin Med* 2017; 6(1).
169. Menon M, Blair PA, Isenberg DA, Mauri C. A Regulatory Feedback between Plasmacytoid Dendritic Cells and Regulatory B Cells Is Aberrant in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity* 2016; 44(3):683–97.

170. Winslow GM, Papillion AM, Kenderes KJ, Levack RC. CD11c+ T-bet+ memory B cells: Immune maintenance during chronic infection and inflammation? *Cell Immunol* 2017; 321:8–17.
171. Llorente L, Richaud-Patin Y, Wijdenes J, Alcocer-Varela J, Maillot MC, Durand-Gasselín I et al. Spontaneous production of interleukin-10 by B lymphocytes and monocytes in systemic lupus erythematosus. *Eur Cytokine Netw* 1993; 4(6):421–7.
172. F. Facciotti, P. Larghi, R. Bosotti, C. Vascoa, N. Gagliani, C. Cordiglieri, S. Mazzara, V. Ranzani, E. Rottoli, S. Curti, A. Penatti, B. Karnani, Y. Kobayashi, M. Crosti, M. Bombaci, J. P. van Hamburg, G. Rossetti, R. Gualtierotti, M. Gerosa, S. Gatti, S. Torretta, L. Pignataro, S. W. Tasj, S. Abrignani, M. Pagani, F. Grassi, P. L. Meroni, R. A. Flavell, J. Geginat. Evidence for a pathogenic role of extrafollicular, IL-10-producing CCR6+B helper T cells in systemic lupus erythematosus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2020.
173. Andrea Joss, Mübeccel Akdis, Alexander Faith, Kurt Blaser and Cezmi A. Akdis. IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway. *Eur J Immunol* 2000; 2000.
174. Ma N, Zhang Y, Liu Q, Wang Z, Liu X, Zhu G et al. B cell activating factor (BAFF) selects IL-10-B cells over IL-10+B cells during inflammatory responses. *Mol Immunol* 2017; 85:18–26.
175. Françoise Rousset, Simone Peyrol, Eric Garcia, Nadia Vezzio, Mauricio Andujar, Jean-Alexis Grimaud, Jacques Banchereau. Long-term cultured CD40-activated B lymphocytes differentiate into plasma cells in response to IL-10 but not IL-4. *Int Immunol* 1995.
176. Hiroshi Ishida, Tony Muchamuel, Shimon Sakaguchi,* Silvia Andrade, Satish Menon, and Maureen Howard. Continuous administration of anti-interleukin 10 antibodies delays onset of autoimmunity in NZB/W F1 mice. *Journal of Experimental Medicine* 1994.
177. Luis Llorente, Yvonne Richaud-Patin, Carlos Garcia-Padilla, Emmanuel Claret, Juan Jakez-Ocampo, Mario H. Cardiel, Jorge Alcocer-Varela, Lilliane Grangeot-Keros, Donato Alarcon-Segovia, John Wijdenes, Pierre Galanaud, and Dominique Emilie. Clinical and biologic effects of anti-interleukin-10 monoclonal antibody administration in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 2000; 2000:1790–800.

178. Michela Manni, Sanjay Gupta, Briana G. Nixon, Casey T. Weaver, Rolf Jessberger, Alessandra B. Pernis. IRF4-Dependent and IRF4-Independent Pathways Contribute to DC Dysfunction in Lupus. *PLoS ONE*; 2015.
179. Geginat J, Vasco M, Gerosa M, Tas SW, Pagani M, Grassi F et al. IL-10 producing regulatory and helper T-cells in systemic lupus erythematosus. *Semin Immunol* 2019; 44:101330.
180. Andrea Becker-Merok, Gro Østili Eilersten, and Johannes C. Nossent. Levels of Transforming Growth Factor- β Are Low in Systemic Lupus Erythematosus Patients with Active Disease. *The Journal of Rheumatology* 2010.
181. Ohtsuka K, Gray JD, Stimmler MM, Toro B, Horwitz DA. Decreased Production of TGF- β by Lymphocytes from Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of immunology* 1998.
182. E Razl, J Dudler, M Lotz, SM Baird, CC Berry RA Eisenberg and DA Carson. Modulation of disease activity in murine systemic lupus erythematosus by cytokine gene delivery. *Lupus* 1995; 1995.
183. Yaswen L, Kulkarni AB, Fredrickson T, Mittleman B, Schiffman R, Payne S et al. Autoimmune manifestations in the transforming growth factor-beta 1 knockout mouse. *Blood* 1996; 87(4):1439–45.
184. K Ohtsuka, JDGray, FP Quismorio Jr, W Lee, and DA Horwitz. Cytokine-mediated down-regulation of B cell activity in SLE effects of interleukin-2 and transforming growth factor-beta. *Lupus* 1999.
185. Kim L. Good, Vanessa L. Bryant, Stuart G. Tangye. Kinetics of Human B Cell Behavior and Amplification of Proliferative Responses following Stimulation with IL-21. *The Journal of Immunology* 2006; 2006:5235–47.
186. Robbins, Yong Sing da Silva, Rosanne Spolski, Warren J. IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. *The Journal of Immunology* 2005; 2005(175):7867–79.
187. Amit K. Maiti, Xana Kim-Howard, Parvathi Viswanathan, Laura Guille'n, Adriana Rojas-Villarraga, Harshal Deshmukh, mHaner Direskeneli, Güher Saruhan-Direskeneli, Carlos Canas, Gabriel J. Tobón, Amr H. Sawalha, Alejandra C. Chernavsky, Juan-Manuel Anaya, Swapan K. Nath. Confirmation of an association between rs6822844 at the IL2-IL21 region and multiple autoimmune diseases: Evidence of a general susceptibility locus. *Arthritis & Rheumatism* 2009; (2009).

188. Deborah Herber, Thomas P. Brown, Spencer Liang, Deborah A. Young, Mary Collins and Kyri Dunussi-Joannopoulos. IL-21 has a pathogenic role in a lupus-prone mouse model and its blockade with IL-21R.Fc reduces disease progression. *The Journal of Immunology* 2007; 2007(178):3822–30.
189. Sebastian Dolf, Wayel H Abdulahad, Johanna Westra, Berber Doornbos-van der Meer, Pieter C Limburg, Cees GM Kallenberg and Marc Bijl. Increase in IL-21 producing T-cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy* 2011; 2011.
190. Rabani M, Wilde B, Hübbers K, Xu S, Kribben A, Witzke O et al. IL-21 dependent Granzyme B production of B-cells is decreased in patients with lupus nephritis. *Clinical immunology* 2018; 188:45–51.
191. M. Nakou, E.D. Papadimitraki, A. Fanouriakis, G.K. Bertsias, C. Choulaki, N. Goulidaki, P. Sidiropoulos, D.T. Boumpas. Interleukin-21 is increased in active systemic lupus erythematosus patients and contributes to the generation of plasma B cells. *Clinical and experimental rheumatology* 2013; 2013(31):172–9.
192. Jason A. Bubier, Thomas J. Sproule, Oded Foreman, Rosanne Spolski, Daniel J. Shaffer, Herbert C. Morse III, Warren J. Leonard, and Derry C. Roopenian. A critical role for IL-21 receptor signaling in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus in BXSB-Yaa mice. *PNAS* 2009; 2009.
193. Krisztina Szabó, Ilona Jámbor, Kitti Pázmándi, Nikolett Nagy, Gábor Papp and Tünde Tarr. Altered Circulating Follicular T Helper Cell Subsets and Follicular T Regulatory Cells Are Indicators of a Derailed B Cell Response in Lupus, Which Could Be Modified by Targeting IL-21R. *International Journal of Molecular Sciences* 2022; 2022.
194. Charles E. Egwuagu, Cheng-Rong Yu. Interleukin 35–Producing B Cells (i35-Breg): A New Mediator of Regulatory B-Cell Functions in CNS Autoimmune Diseases. *Crit Rev Immunol.* 2015:49–57.
195. Han Ouyang, MS, Yong-bing Shi, MD, PhD, Zhi-chun Liu, MD, PhD, Zhi Wang, MD, PhD, Sheng Feng, MS, Shu-min Kong, MD, PhD and Ying Lu, MS. Decreased Interleukin 35 and CD4+EBI3+ T cells in Patients With Active Systemic Lupus Erythematosus. *The American Journal of the Medical Sciences* 2014.
196. Di He MLaBL. Interleukin-35 as a New Biomarker of Renal Involvement in Lupus Nephritis Patients. *Tohoku J. Exp. Med.* 2018.
197. F Qiu, L Song, N Yang and X Li. Glucocorticoid downregulates expression of IL-12 family cytokines in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 2013.

198. Z Cai, CK Wong, NW Kam, J Dong, D Jiao, M Chu, CWK Lam and LS Tam. Aberrant expression of regulatory cytokine IL-35 in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2015.
199. Z. Cai, C. K. Wong, J. Dong, M. Chu, D. Jiao, N. W. Kam, C. W. K. Lam, and L. S. Tam. Remission of systemic lupus erythematosus disease activity with regulatory cytokine interleukin (IL)-35 in Murphy Roths Large (MRL)/lpr mice. *Clinical and experimental immunology* 2015.
200. Patel M, Oni L, Midgley A, Smith E, Tullus K, Marks SD et al. Increased concentration of plasma TNFR1 and TNFR2 in paediatric lupus nephritis. *Lupus* 2016; 25(9):1040–4.
201. Fanny Baran-Marszak, Christelle Laguillier, Ibtissam Youlyouz, Jean Feuillard, Xavier Mariette, Remi Fagard, Martine Raphael. Effect of tumor necrosis factor alpha and infliximab on apoptosis of B lymphocytes infected or not with Epstein–Barr virus. *Cytokine* 2006.
202. Sharapova TN, Romanova EA, Soshnikova NV, Belogurov AA, Lomakin YA, Sashchenko LP et al. Autoantibodies from SLE patients induce programmed cell death in murine fibroblast cells through interaction with TNFR1 receptor. *Sci Rep* 2020; 10(1):11144.
203. Ting AT, Bertrand MJM. More to Life than NF- κ B in TNFR1 Signaling. *Trends Immunol* 2016; 37(8):535–45.
204. Sudeepta Aggarwal, Sastry Gollapudi, and Sudhir Gupta. Increased TNF-alpha-induced apoptosis in lymphocytes from aged humans changes in TNF-alpha receptor expression and activation of caspases. *The Journal of Immunology* 1999.
205. Zhang N, Wang Z, Zhao Y. Selective inhibition of Tumor necrosis factor receptor-1 (TNFR1) for the treatment of autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 2020; 55:80–5.
206. Najia Shakoor, Margaret Michalska, Charlotte A Harris, Joel A Block. Drug-induced systemic lupus erythematosus associated with etanercept therapy. *Lancet* 2002.
207. Hiroko Shibata, Yasuo Yoshioka, Yasuhiro Abe, Akiko Ohkawa, Tetsuya Nomura, Kyoko Minowa et al. The treatment of established murine collagen-induced arthritis with a TNFR1-selective antagonistic mutant TNF. *Biomaterials* 2009.

208. A. Ochaion, S. Bar-Yehuda, S. Cohen, F. Barer, R. Patoka, H. Amital et al. The anti-inflammatory target A3 adenosine receptor is over-expressed in rheumatoid arthritis, psoriasis and Crohn's disease. *Cell Immunol*; 2009:115–22.
209. Katia Varani, Gaetano Caramori, Fabrizio Vincenzi, Ian Adcock, Paolo Casolari, Edward Leung et al. Alteration of Adenosine Receptors in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2005; 2005.
210. Annalisa Ravani 1, Fabrizio Vincenzi 1, Alessandra Bortoluzzi 2, Melissa Padovan 2, Silvia Pasquini 1, Stefania Gessi 1, Stefania Merighi 1, Pier Andrea Borea 1, Marcello Govoni 2 and Katia Varani 1,* . Role and Function of A2A and A₃ Adenosine Receptors in Patients with Ankylosing Spondylitis, Psoriatic Arthritis and Rheumatoid Arthritis. *International Journal of Molecular Sciences* 2017; 2017.
211. Gao N, Dresel J, Eckstein V, Gellert R, Störch H, Venigalla RKC et al. Impaired suppressive capacity of activation-induced regulatory B cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* 2014; 66(10):2849–61.
212. Zhimin Lu Dinglei Su, Dandan Wang, Xia Li, Xuebing Feng, and Lingyun Sun. Elevated apoptosis and impaired proliferation contribute to downregulated peripheral $\gamma \delta$ T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical and Developmental Immunology* 2013.
213. Nobuhiko Imahashi, Rafet Basar, Yuefan Huang, Fang Wang, Natalia Baran, Pinaki Prosad Banerjee, Junjun Lu, Ana Karen Nunez Cortes, Nadima Uprety, Emily Ensley, Luis Muniz--Feliciano, Tamara J Laskowski, Judy S Moyes, May Daher, Mayela Mendt, Lucila N Kerbauy, Mayra Shanley, Li Li, Francesca Lorraine Wei Inng Lim, Hila Shaim, Ye Li, Marina Konopleva, Michael Green, Jennifer Wargo, Elizabeth J Shpall, Ken Chen, Katayoun Rezvani . Activated B cells suppress T-cell function through metabolic competition. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2022; 2022.
214. Duddy M, Niino M, Adatia F, Hebert S, Freedman M, Atkins H et al. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J Immunol* 2007; 178(10):6092–9.
215. Wilde B, Thewissen M, Damoiseaux J, Knippenberg S, Hilhorst M, van Paassen P et al. Regulatory B cells in ANCA-associated vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2013; 72(8):1416–9.
216. Julia Sieber, Capucine Daridon, Sarah J Fleischer, Vanessa Fleischer, Falk Hiepe, Tobias Alexander et al. Active systemic lupus erythematosus is associated with

a reduced cytokine production by B cells in response to TLR9 stimulation. *Arthritis Research & Therapy* 2014; 2014.

217. Vita Ozola, Mark Thorand, Martina Diekmann, Ramatullah Qurishi, Britta Schumacher, Kenneth A. Jacobson, Christa E. Müller. 2-Phenylimidazo[2,1-i]purin-5-ones: Structure–Activity Relationships and Characterization of Potent and Selective Inverse Agonists at Human A3 Adenosine Receptors. *Bioorg Med Chem.*; 2003.

218. James L. Sung, Jack T. Lin, James D. Gorham. CD28 co-stimulation regulates the effect of transforming growth factor- β 1 on the proliferation of naïve CD4+ T cells. *International Immunopharmacology* 2002.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung bisher untersuchter Wirkmechanismen und Stimulationsmechanismen regulatorischer B-Zellen.....	9
Abb. 2	Schematische zusammenfassende Darstellung des Adenosinmetabolismus, sowie der Signaltransduktion über den A3-Adenosinrezeptor (A3R).....	18
Abb. 3	Gatingstrategie für die B _{reg} . Darstellung mittels Flowlogic.....	34
Abb. 4	Beispielhafte schematische Darstellung der Δ Ct-Methode.....	39
Abb. 5	Beispielhafte Darstellung der Proliferation von T-Zellen eines SLE-Patienten.....	42
Abb. 6	Zusammenfassende schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der Suppressionsassays.....	44
Abb. 7	Gatingstrategie für die Suppressionsassays. Darstellung mittels Flowlogic	46
Abb. 8	Unterschiede regulatorischer B-Zellen von SLE-Patienten und gesunden Probanden unter zusätzlicher Betrachtung von CD11c.....	48
Abb. 9	Unterschiede der in dieser Arbeit neu definierten Gruppe regulatorischer B-Zellen von SLE-Patienten und gesunden Probanden unter zusätzlicher Betrachtung von CD11c.....	49
Abb. 10	Unterschiede im Anteil CD11c+ regulatorischer B-Zellen (in %) im Vergleich zwischen SLE-Patienten und gesunden Probanden.....	50
Abb. 11	mRNA-Expression der Zytokine und Zytokinrezeptoren in humanen B-Zellen bei Gesunden und SLE-Patienten.....	51

Abb. 12	mRNA-Expression des untersuchten A3R in humanen B-Zellen bei Gesunden und SLE-Patienten.....	52
Abb. 13	Relative MFI der T-Zellen bezogen auf den Zeitpunkt 0 (t0) unter Hinzugabe der A3R-Agonisten- und Antagonisten im Vergleich zu nicht mit diesen stimulierten Proben am Beispiel der 10:1 Konzentration an B-Zellen zu Rest-PBMCs. Die T-Zellen wurden mit Anti-CD3 und Anti-CD28 stimuliert. Die B-Zellen wurden mit CpG stimuliert. (n = 3-7).....	57
Abb. 14	Anteil proliferierter T-Zellen in Prozent zur Gesamtzellzahl unter Hinzugabe der A3R-Agonisten- und Antagonisten im Vergleich zu nicht mit diesen stimulierten Proben am Beispiel der 10:1 Konzentration an B-Zellen zu Rest-PBMCs. Die T-Zellen wurden mit Anti-CD3 und Anti-CD28 stimuliert. Die B-Zellen wurden mit CpG stimuliert. (n = 3-7).....	60

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Materialien für die Blutabnahme und PBMC-Isolierung.....	20
Tabelle 2	Materialien für die B-Zell Isolierung.....	21
Tabelle 3	Reagenzien für die Durchflusszytometrie.....	22
Tabelle 4	Verwendete Materialien bei der RNA-Isolation, cDNA-Synthese und PCR	23
Tabelle 5	Verwendete Primer (HT = Hybridisierungstemperatur).....	24
Tabelle 6	Verwendete Materialien für die Zellkulturen und Suppressionsassays	26
Tabelle 7	Geräte.....	28

Tabelle 8	Übersicht der Programmierung des PCR-Systems	38
Tabelle 9	Übersicht der Ergebnisse zur Wirkung der Adenosin A3-Adenosinrezeptor-Agonisten auf die MFI (<i>mean fluorescence intensity</i>) der T-Zellen.....	55
Tabelle 10	Übersicht der Ergebnisse zur Wirkung der A3-Adenosinrezeptor-Antagonisten auf die MFI (<i>mean fluorescence intensity</i>) der T-Zellen.....	56
Tabelle 11	Übersicht der Ergebnisse zur Wirkung der A3-Adenosinrezeptor-Agonisten auf die prozentuale Proliferation der T-Zellen	59
Tabelle 12	Übersicht der Ergebnisse zur Wirkung der A3-Adenosinrezeptor-Antagonisten auf die prozentuale Proliferation der T-Zellen	59

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen Personen bedanken, die mich in meinem Vorhaben der Dissertation unterstützt haben. Ohne ihre Hilfe und ihren Zuspruch hätte diese Arbeit niemals entstehen können.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich gerne meinem Doktorvater Prof. Dr. Georg Pongratz aussprechen, der mich während der gesamten Zeit immer erstklassig betreut hat und es mir ermöglicht hat überhaupt an diesem Projekt mitarbeiten zu können. Seine Expertise und Unterstützung waren für den Erfolg und die Entstehung dieser Arbeit von unschätzbarem Wert. Ferner möchte ich mich gerne bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Germing für seine wissenschaftliche Betreuung als Zweitgutachter dieser Arbeit herzlich bedanken. In ganz besonderem Maße würde ich mich gerne bei Frau Dr. Magdalena Siekierka-Harreis, die mich sowohl in die Rheumatologie, als auch in das Thema des systemischen Lupus Erythematoses einführte und mir dadurch die Möglichkeit der Mitarbeit in diesem wunderbaren Laborteam eröffnete. Ihre konstruktive Kritik hat mir geholfen diese Arbeit stetig zu verbessern. Zusätzlich bedanke ich mich hiermit beim gesamten Team des Hiller Forschungszentrum für Rheumatologie. Hervorheben möchte ich hierbei Herrn Dr. Dennis Bleck, der mir bei Fragen rund um die Statistik stets eine Hilfe war. Ohne seine kritischen Beobachtungen und Beiträge rund um die Thematik und Laborarbeit hätte diese Arbeit nicht zustande kommen können. Ebenso für Hilfe und Anregungen sowie ausführliche Erklärungen bei statistischen Fragen möchte ich mich bei Herrn Tim Filla bedanken. Darüber hinaus bedanke ich mich herzlich bei Frau Dr. Nadine Honke, Frau Birgit Opgenoorth, Frau Ellen Bleck, Frau Claudia Heier und Frau Katharina Krebber, die mich in die Laborarbeit einführten und auch stets für nette und informative Gespräche offen waren. Zudem möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die über ihre Blutspende die durchgeführten Versuche ermöglichen.

Für dem unermüdlichen moralischen Beistand und ihre stetige Unterstützung möchte ich mich außerdem bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken. Ein besonderer Dank gebührt hierbei meinem Freund Markus sowie meiner guten Freundin Winnie, die mich vor allem während der Schreibphase unterstützt und ermutigt haben. Zuletzt möchte ich meiner gesamten Familie, insbesondere meinen Eltern Giuliana und Eric, meinem Bruder Cédric und meinen Großeltern Jeannot, Adelina und Tonino für ihren unermüdlichen Beistand ganz besonders von Herzen danken.