Aus der Klinik für Rheumatologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Jörg Distler

Untersuchung des katecholaminergen Einflusses auf die immunmodulatorische Funktion humaner, TLR9-aktivierter *CD*19+ B-Zellen *in vitro*.

Dissertation

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

vorgelegt von

Christine Kess

2026

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez.:
Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker
Erstgutachter: PD Dr. Torsten Lowin
Zweitgutachter: Prof. Dr. Hans Neubauer

Meiner Familie und meinem Partner

Zusammenfassung

In der Literatur ist bereits bekannt, dass das sympathische Nervensystem (SNS) entzündliche Prozesse modulieren kann. Neuere Studien zeigen, dass das SNS auch bei Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis eine zentrale Rolle in der Regulation von Entzündungsreaktionen einnimmt. Sowohl der Schweregrad als auch das Fortschreiten der Krankheit werden dabei durch die Verteilung sympathischer Nervenfasern, sowie durch die Expression adrenerger Rezeptoren (ADR) auf Immunzellen mitbestimmt. Regulatorische Immunzellen können chronische Entzündungsprozesse abschwächen, unter anderem durch Ausschüttung entzündungshemmender Zytokine. In der vorliegenden Arbeit wurden B-Zellen (BZ) untersucht, um den Einfluss adrenerger Neurotransmitter auf immunologische Reaktionen zu analysieren. Obwohl Katecholamine bereits als mögliche Regulatoren von Entzündungsprozessen über die Modulation des TLR-9-Signalwegs identifiziert wurden, sind die zugrunde liegenden Signalkaskaden bislang nur unvollständig verstanden und wurden bisher nicht in humanen Zelllinien untersucht. Es konnte bereits gezeigt werden, dass BZ in der Lage sind, endogene Katecholamine zu produzieren und zu speichern. Dadurch rückt die Frage in den Fokus, inwiefern Katecholamine die Funktion regulatorischer B-Zellen modulieren könnten.

In dieser Arbeit wurden die regulatorischen Effekte adrenerger Rezeptoren in TLR-9-aktivierten *CD*19+ BZ untersucht. Hierzu wurde die Expression essenzieller Proteine des Katecholaminmetabolismus und adrenerger Rezeptoren mittels Durchflusszytometrie und Western Blot-Technik analysiert. Nach der Stimulation der BZ mit Agonisten und Antagonisten für ADRs wurde anhand der Produktion pro- (IL-6, TNF-α) und antiinflammatorischer (IL-10) Zytokine mittels *ELISA* das entzündliche Antwortverhalten quantifiziert.

Unsere Untersuchungen zeigen, dass BZ über adrenerge Signalwege immunmodulatorische Funktionen ausüben und am Katecholaminmetabolismus beteiligt sind. Grundlage hierfür ist die Expression von ADRs. Wir konnten die Rezeptorsubtypen α1A, α2B, β1, β2 und β3 nachweisen. Die CpG-Stimulation führte zu einem signifikanten Anstieg der Expression von α1A-, α2B- und β3-ADRs. Die Stimulation der α1A-ADRs und Modulation der α2B-ADRs resultierten in einer Steigerung der IL-10-Produktion. Auch die Agonisierung der β-ADRs induzierten antiinflammatorische Effekte. Darüber hinaus konnte in einer untersuchten Probe die MAO-A und MAO-B in den Zellen nachgewiesen werden. Dieser Einzelbefund liefert erste vorläufige Hinweise auf potenzielle auto- und parakrine Wirkmechanismen B-zellulärer Katecholamine.

Diese Ergebnisse tragen zu einem besseren Verständnis regulatorischer Funktionen des SNS im Zusammenspiel mit dem Immunsystem bei, vermittelt durch adrenerge Rezeptoren. Die Daten könnten perspektivisch als Grundlage zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze für Autoimmunerkrankungen beitragen.

Abstract

In immunology it is well established that the sympathetic nervous system (SNS) can modulate inflammatory processes. Recent studies indicate that the SNS also plays a central role in regulating inflammatory responses in autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis. The disease severity and progression are influenced by the distribution of sympathetic nerve fibers and the expression of adrenergic receptors (ADRs) on immune cells. Regulatory immune cells can attenuate chronic inflammatory processes by releasing anti-inflammatory cytokines. In the present study, B-cells (BC) were used to investigate the adrenergic influences on immunological responses. Although catecholamines have already been identified as potential regulators of inflammatory processes through modulation of the TLR-9 signaling pathway, the underlying signaling cascades remain insufficiently understood and have not yet been investigated in human cell lines. Previous studies have demonstrated that BCs can produce and store endogenous catecholamines, raising the question of whether catecholamines might modulate the function of regulatory BCs.

In this thesis, the regulatory effects of adrenergic receptors in TLR-9-activated *CD*19+ BCs are examined. To this end, the expression of essential proteins involved in catecholamine metabolism and of adrenergic receptors is analyzed using flow cytometry and Western blotting. The influence of adrenergic signaling on the inflammatory response of BCs is assessed by stimulation the cells with agonist and antagonist of ADRs and quantifying the pro-(IL-6, TNF-α) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines using *ELISA*.

Our findings show that BCs exert immunomodulatory functions through adrenergic signaling pathways and are involved in catecholamine metabolism. This is enabled by their expression of ADRs. We were able to detect the receptor subtypes α1A, α2B, β1, β2, and β3. CpG stimulation resulted in a significant increase in the expression of α1A-, α 2B-, and β3-ADRs. Activation of the α1A-ADR and modulation of the α2B-ADR led to an increase in IL-10 production. Agonism at β-ADR also induced anti-inflammatory effects. Furthermore, MAO-A and MAO-B were detected in one analyzed sample. This single finding provides initial evidence for potential autocrine and paracrine mechanisms mediated by B-cell-derived catecholamines.

These findings contribute to a better understanding of the regulatory functions of the SNS in interaction with the immune system mediated by the adrenergic messenger system and may, in the long term, support the development of new therapeutic approaches for autoimmune diseases.

Abkürzungsverzeichnis

A	Area
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
ADR	Adrenerger Rezeptor
AK	Antikörper
AP-1	Aktivierendes Protein 1
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	*Bicinchoninic acid*
B_{REG}	Regulatorische B-Zelle
BRL	BRL-37344
BSA	Bovines Serumalbumin
BZ	B-Zellen
BZR	B-Zell-Rezeptor
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	*Cluster of differentiation*
CIA	Kollagen-induzierte-Arthritis
CL	CL-316,243
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CREB	*cAMP response element binding protein*
CRP	C-reaktives Protein
DAT	Dopamin-Transporter
dd	doppelt destilliert
Dex	Dexmedetomidine
DMARDs	*disease-modifying antirheumatic Drugs*
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Doxa	Doxazosin
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
ELISA	*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*
ERK	*Extracellular signal regulated Kinase*
FSC	*Forward Scatter*
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDT	Guanosindiphosphat
gp	Glykoprotein
GPCR	*G-protein coupled receptor*
GTP	Guanosintriphosphat
H	*Height*
HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
HRP	Horseradish Peroxidase
ICI	ICI-118,551
IFR	Interferon-regulatorischer Faktor
Ig	Immunglobulin
IK	Intrazelluläres Kompartiment
IL	Interleukin
INF	Interferon
IS	Immunsystem
Iso	Isoproterenol
KW-Test	Kruskal-Wallis-Test
L	L-748,337
M	Mittelwert
MAO	Monoaminooxidase
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MB	*MicroBeads*
Mdn.	Median
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	*Major Histocompatibility Complex*
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MWU-Test	Mann-Whitney-U-Test
MYD88	*Myeloide differentiation primary response gene 88*
n	Stichprobengröße
Nad	Nadolol
NE	Norepinephrin
NET	Norepinephrin-Transporter
NF-κB	*Nuclear Factor kappa light chain enhancer of activated B-cells*
NK-Zellen	Natürliche-Killer-Zellen

PAMPs	*Pathogen associated molecular patterns*
PBMC	*Peripheral Blood Mononuclear Cell*
PBS	*Phosphate Buffered Saline*
Phen	Phenylephrine
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PM	Plasmamembran
PNMT	Phenylethanolamin-N-Methyltransferase
R	Rezeptor
r	Pearson-Korrelationskoeffizient
RA	Rheumatoide Arthritis
RB	*Running Buffer*
RBCL	*Red Blood Cell Lysis*
RNA	Ribonukleinsäure
RS	RS-79948
RT	Raumtemperatur
SB	*Separation Buffer*
SD	*Standard deviation*
SDS	*Sodium dodecyl sulfate*
SSC	*Side Scatter*
SNS	Sympathisches Nervensystem
STAT3	*Signal transducer and activator of transcription 3*
TBS	*Tris-buffered saline*
TGF β	*Transforming Growth Factor β*
TH	Tyrosinhydroxylase
TH-Zelle	T-Helfer-Zelle
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TZ	T-Zellen
v/v	*volume to volume*
VMAT	Vesikulärer Monoamintransporter
VEGF	*Vascular Endothelial Growth factor*
W	*Width*
w/v	*weight to volume*
WB	Western Blot
x g	g-Kraft
z	z-Statistik
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
1.1 Das Immunsystem 1
1.1.1 B-Zellen 1
1.1.2 Zytokine 3
1.1.3 *Toll-like*-Rezeptoren & Pathogen-assoziierte molekulare Muster 6
1.2 Rheumatoide Arthritis (RA) 8
1.3 Autonomes Nervensystem 11
1.4 Katecholamine 11
1.4.1 Katecholaminsynthese und -Abbau 12
1.4.2 Adrenerge Rezeptoren 13
1.4.3 Katecholamine im Immunsystem 15
1.5 Bidirektionale Kommunikation zwischen Nervensystem und Immunsystem bei Entzündungen 17
1.6 Einfluss zwischen autonomem Nervensystem und Immunsystem bei RA 20
1.7 Ziele der Arbeit 24
2 Material und Methoden 25
2.1 Angaben zu den Proband-/innen & Aktenzeichen des Ethikvotums 25
2.2 Material 25
2.2.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien 26
2.2.2 Chemikalien, Reagenzien, Medien und Medienzusätze 27
2.2.3 Antikörper und Kits 28
2.2.4 Software 29
2.3 Zellkulturmedium und Zellzahlbestimmung 30
2.4 Probengewinnung 30
2.4.1 Isolation und Aufarbeitung peripherer mononukleärer Zellen 30
2.4.2 Isolation und Aufarbeitung *CD*19+ BZ 31
2.4.3 Aktivierung *CD*19+ BZ mittels CpG ODN 2006 33
2.5 Durchflusszytometrie 33
2.5.1 Färbung *CD*19+ B-Zell-Proben 33
2.5.2 Messung am Durchflusszytometer 34
2.5.3 Auswertung und statistische Analyse 35
2.6 Enzyme-linked Immunosorbent Assay 37
2.6.1 Probenvorbereitung und Puffer 37
2.6.2 Durchführung 38

2.6.3 Auswertung und statistische Analyse 39
2.7 Western Blot 40
2.7.1 Probenvorbereitung und Puffer 40
2.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration 41
2.7.3 Gelelektrophorese und Transfer 42
2.7.4 Immunmarkierung 43
2.7.5 Auswertung 45
3 Ergebnisse 46
3.1 Expression adrenerger Rezeptoren *CD*19+ naiver und CpG-stimulierter humaner B-Zellen 46
3.1.1 Expression des adrenergen α1A-Rezeptors 46
3.1.2 Expression des adrenergen α1B-Rezeptors 47
3.1.3 Expression des adrenergen α2A-Rezeptors 47
3.1.4 Expression des adrenergen α2B-Rezeptors 48
3.1.5 Expression des adrenergen β1-Rezeptors 49
3.1.6 Expression des adrenergen β2-Rezeptors 50
3.1.7 Expression des adrenergen β3-Rezeptors 51
3.2 Zytokinproduktion *CD*19+, CpG-aktivierter humaner B-Zellen unter Stimulation mit adrenergen Rezeptor-Agonisten und Antagonisten 52
3.2.1 Einfluss α1-ADRs auf die IL-6-/ IL-10-Produktion 52
3.2.2 Einfluss α2-ADRs auf die IL-6-/ IL-10-Produktion 54
3.2.3 Einfluss β-ADRs auf die IL-6-/ IL-10-Produktion 55
3.2.4 Einfluss von Norepinephrin auf die IL-6-/ IL-10-Produktion 67
3.2.5 Einfluss von ADR-Liganden auf die TNF-α-Produktion 68
3.3 Nachweis essenzieller Proteine der Katecholamin-Aufnahme und des Abbaus in *CD*19+, humanen B-Zellen 68
3.3.1 Norepinephrin- und Dopamin-Transporter 68
3.3.2 Monoaminooxidasen A und B 69
3.3.3 TH und des ADR-α1B 70
4 Diskussion 71
4.1 Adrenerge Rezeptoren und deren immunmodulatorischen Eigenschaften 71
4.2 Proteine des Katecholaminmetabolismus in B-Zellen 79
5 Zusammenfassung und Ausblick 81
6 Literatur- und Quellenverzeichnis 84
7 Anhang 94

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem (IS) ist ein komplexes Netzwerk aus Zellen und Geweben, das über das lymphatische System und den Blutkreislauf miteinander kommuniziert. Es schützt den Organismus vor Infektionen und Gewebeschädigungen durch Pathogene, entfernt entartete oder abgestorbene Zellen und gewährleistet die Wundheilung (1).

Das IS lässt sich in die angeborene, unspezifische sowie die adaptive, spezifische Immunabwehr unterteilen. Beide Komponenten interagieren miteinander, regulieren und ergänzen sich. Das angeborene IS reagiert rasch und unspezifisch auf allgemein vorkommende Pathogenmerkmale, sogenannte *pathogen-associated molecular pattern*s (*PAMPs*) (1). Zu den Bestandteilen des angeborenen IS zählen Phagozyten wie Makrophagen und Granulozyten, die die initiale Immunantwort vermitteln und Entzündungsmediatoren freisetzen. Diese Zellen bekämpfen Pathogene durch Phagozytose und präsentieren im Lymphknoten Antigene an Zellen der adaptiven Immunabwehr. Auch Epithelzellen und Fibroblasten produzieren Mediatoren, die weitere Immunzellen aktivieren und an den Entzündungsherd rekrutieren. Ein weiterer Effektormechanismus des angeborenen IS ist das Komplementsystem, ein Proteinkomplex, der Zellmembranen perforieren kann (2).

Das adaptive IS hingegen ist in der Lage neue Pathogene zu erkennen und gezielt auf sie zu reagieren. Aufgrund eines immunologischen Gedächtnisses schützt es den Organismus nachhaltig vor erneuten Infektionen, indem es bekannte Pathogene anhand spezifischer Antigene schnell und effektiv wiedererkennt und selektiv bindet. Zu den Zellen des erworbenen Immunsystems gehören T- und B-Zellen (TZ, BZ) (1). T-Lymphozyten werden unterteilt in T-Helferzellen (TH-Zellen) (*CD*4+) (*cluster of differentiation*), welche die Immunantwort koordinieren, sowie zytotoxische T-Zellen (*CD*8+), die infizierte oder entartete Zellen gezielt abtöten (3).

1.1.1 B-Zellen

Zu den Zellen adaptiver Immunität gehören B- und T-Lymphozyten, welche 25-40 % aller Leukozyten im peripheren Blut ausmachen. BZ entwickeln sich aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks und sind insbesondere für die humorale Immunität zuständig (1). Durch die Bildung von Antikörpern (AK) tragen sie zur Eliminierung pathogener Antigene bei. Dies geschieht unter anderem durch Opsonierung, Aktivierung des Komplementsystems und zytokinvermittelte Effekte (4).

Reife BZ können über membrangebundene Immunglobuline, sogenannte BZ-Rezeptoren (BZR), spezifische Antigene erkennen. Dafür sind mehrere Reifungs- und Differenzierungsstufen notwendig. Die Reifung erfolgt zunächst im Knochenmark. Durch V(D)J-Rekombination entsteht dort eine Vielzahl an polyreaktiven Antigenrezeptoren (BZR). Im Anschluss erfolgt eine positive Selektion, bei der geprüft wird, ob BZ funktionsfähige Rezeptoren auf der Oberfläche exprimieren. Daraufhin folgt die negative Selektion, bei der BZ mit autoreaktiven BZR in die Apoptose überführt oder durch Rezeptorumgestaltung modifiziert werden, um die Autoreaktivität zu beseitigen. Die so entstandenen autotoleranten BZ wandern über die Blutbahn in sekundäre lymphatische Organe (zum Beispiel Milz und Lymphknoten), wo sie auf ihr spezifisches Antigen treffen können. Dort werden sie durch Antigenpräsentation selektiv aktiviert. Auch in diesen Organen erfolgen weitere Selektionsprozesse - nur autotolerante BZ durchlaufen die nächste Reifungsstufe. Autoreaktive Zellen werden in die Apoptose geleitet oder durch zusätzliche Modulation ihrer Rezeptoren toleriert (5,6).

Über den BZR werden spezifische Antigene endozytotisch aufgenommen und anschließend T-Zellen präsentiert. Antigene, die eine TZ-abhängige Aktivierung initiieren, werden gemeinsam mit *MHC*-II-Molekülen (*Major Histocompatibility Complex)* als Antigen-*MHC*-Komplex auf der Zelloberfläche präsentiert und vom TZ-Rezeptor einer TH-Zelle erkannt. Die TH -Zelle aktiviert die BZ durch die Ausschüttung von Zytokinen, sowie durch die Bindung kostimulatorischer Oberflächenmoleküle.

Neben der TZ-abhängigen Aktivierung kann auch eine TZ-unabhängige Aktivierung der BZ erfolgen. Diese wird durch die Kreuzvernetzung mehrerer B-Zell-Rezeptoren ausgelöst. Die dabei aktivierenden Antigene stammen überwiegend von Bakterien und bestehen meist aus repetitiven Molekülen wie Oberflächenpolysacchariden oder unmethylierter CpG-DNA (Desoxyribonukleinsäure). Im Rahmen der TZ-unabhängigen Aktivierung können BZ mikrobielle Bestandteile auch direkt über Toll-like-Rezeptoren (TLRs) erkennen, wodurch intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden ausgelöst werden. Zusätzlich sind kostimulatorische Signale erforderlich, ähnlich der TZ-abhängigen Aktivierung (1,7–9).

Durch die Antigenerkennung und Aktivierung reifer, naiver BZ werden Differenzierungsprozesse zu antikörperproduzierenden Plasmazellen ausgelöst. Plasmazellen exprimieren den BZR nicht mehr auf ihrer Oberfläche. AK stellen die sezernierte Form des BZR mit identischer Antigenspezifität dar und verhindern die Ausbreitung von Erregern durch Neutralisation, Opsonierung und fördern deren Eliminierung durch weitere Komponenten des Immunsystems – beispielsweise durch Makrophagen (1,2,10–12).

Nach einer Immunreaktion können sich BZ auch zu Gedächtnis-BZ differenzieren. Diese tragen denselben BZR wie ihre Mutterzelle und können bei erneutem Auftreten des spezifischen, pathogenassoziierten Antigens schnell und effizient reagieren (1,2,13)

Regulatorische BZ (B_{REGS}), eine Subpopulation von BZ, besitzen immunmodulatorische, insbesondere immunsupressive Eigenschaften. Sie sind in der Lage Entzündungsprozesse zu beenden, überschießende oder chronische Immunreaktionen zu dämpfen, sowie Selbsttoleranz zu fördern und Autoimmunerkrankungen entgegenzuwirken (14). Dies geschieht vor allem durch die Freisetzung immunsuppressiver Zytokine, wie Interleukin-10 (IL-10) und *Transforming Growth Factor-β* (*TGF-β*) (7,15–18). Diese Mediatoren hemmen die Aktivierung weiterer Immunzellen. Auch bei der Herunterreguliereng der Typ-1-T-Helferzell-Antwort, die eine zentrale Rolle in der Pathogenese autoimmuner Erkrankungen spielt, kommt der IL-10-Produktion der BZ eine entscheidende Rolle zu (14,19).

Autoimmunität kann durch BZ gefördert werden. Dies geschieht unter anderem durch die Bildung von Auto-AK, die Präsentation von Autoantigenen an TZ und die Sekretion proinflammatorischer Zytokine (20).

Leukozyten lassen sich anhand spezifischer Membranproteine unterscheiden, die den sogenannten *cluster of differentiation* (*CD*) zugeordnet sind. Ein charakteristischer Marker für BZ, der in nahezu allen Entwicklungsstadien exprimiert wird, ist *CD*19. Dies ist ein transmembranes Glykoprotein, das als Ko-Rezeptor fungiert und die Aktivierungsschwelle des BZR senkt (21,22). Die Expression von *CD*19 ist auf reifen BZ etwa dreimal so hoch wie auf unreifen BZ. Während der Differenzierung zu Plasmazellen geht die *CD*19-Expression weitgehend verloren (10–12).

1.1.2 Zytokine

Zytokine sind essenzielle Proteine beziehungsweise Botenstoffe des Immunsystems, die sowohl in der angeborenen als auch in der adaptiven Immunantwort freigesetzt werden. Sie werden von Immunzellen sowie von Nicht-Immunzellen (wie Fibroblasten oder Endothelzellen) synthetisiert und wirken autokrin, parakrin und endokrin. Ihre Funktionen umfassen die pro- und antiinflammatorische Modulation der Entzündungsreaktion. Darüber hinaus beeinflussen Zytokine das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung und die Apoptose. Die Signalwirkung erfolgt durch die Bindung an spezifische Rezeptoren (23). Zytokine lassen sich in verschiedene Gruppen unterteilen, darunter Interferone, Interleukine, Tumornekrosefaktoren (TNF), Chemokine und Wachstumsfaktoren (1). In der vorliegenden Arbeit wird insbesondere die von BZ-vermittelte Produktion von TNF-*α*, IL-6 und IL-10 untersucht.

TNF-*α* ist ein zentraler, proinflammatorischer Mediator, der von verschiedenen Zelltypen, wie Monozyten und Makrophagen produziert wird (24). Nach Stimulation können auch aktivierte TZ, BZ und Natürliche-Killer-Zellen (NK-Zellen) TNF-*α* ausschütten (25). Seine Signalwirkung vermittelt TNF-*α* durch Bindung an zwei Rezeptoren (R): TNF-R1, der ubiquitär auf nahezu allen menschlichen Geweben exprimiert wird und TNF-R2, der vorwiegend auf Immunzellen lokalisiert ist (26).

Der TNF-R1-vermittelte Signalweg induziert Immunabwehr gegen Krankheitserreger, fördert Entzündungsreaktionen im Gewebe sowie Zellüberleben und Proliferation durch Rekrutierung von Immunzellen. Gleichzeitig kann er aber auch apoptotische Signalwege aktivieren und somit Zelltod verursachen (26).

Über den TNF-R2-Signalweg wird die Homöostase durch Förderung der Geweberegeneration, Wundheilung, Zellproliferation und Zellüberleben aufrechterhalten. Auch auf regulatorischen TZ spielen TNF-R2 zur Immunsuppression eine Rolle (26). Eine übermäßige Aktivierung der TNF-*α*-Signalwege wird mit chronischen Entzündungen, Wundheilungsstörungen sowie Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis (RA) in Verbindung gebracht (26–28). Während des Gewebe-*Remodelings* und der Angiogenese sind Matrix-Metalloproteasen (MMP) beteiligt, die den selektiven Abbau der extrazellulären Matrix (ECM) ermöglichen. TNF-*α* fördert die Aktivierung von MMP. Hohe TNF-*α*- und MMP-Level konnten in chronischen Entzündungsprozessen nachgewiesen werden, wobei eine übermäßige Zerstörung der ECM mit pathologischen Zuständen wie der RA assoziiert ist (28).

TNF-*α* kann zudem den *NF-κB*-Signaltransduktionsweg (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) aktivieren, welcher die Ausschüttung weiterer proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, sowie die MMP-Produktion durch Fibroblasten fördert (28–30). Ein weiterer immunmodulatorischer Effekt von TNF-*α* besteht in der Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von BZ, unter anderem zu antikörperproduzierenden Plasmazellen (31,32).

IL-6 ist ein multifunktionales Zytokin mit proinflammatorischen und immunstimulierenden Eigenschaften (29). Es wird während Infektionen oder Gewebeschädigung vor allem von Monozyten und Makrophagen produziert und initiiert eine koordinierte Immunantwort durch Aktivierung von Immunzellen, hämatopoetischen Prozessen und der Akute-Phase-Reaktion durch die Freisetzung akuter-Phase-Proteine, wie C-reaktives Protein (CRP). Dies geschieht unter anderem durch die Rekrutierung von Makrophagen und Leukozyten sowie durch die Aktivierung von Lymphozyten (33–37). Des Weiteren wird IL-6 auch von BZ, TZ, Fibroblasten, Keratinozyten, Endothelzellen und dendritischen Zellen gebildet (24,30,34). Es

vermittelt die Fieberreaktion und fördert die Energiemobilisation, unter anderem durch Lipolyse und Fettsäureoxidation (35,38,39). Die Expression wird durch andere Zytokine wie TNF-α und IL-1β, durch die Aktivierung von TLRs, sowie durch Stressreaktionen induziert (34–36).

IL-6 bindet entweder an membrangebundene oder an lösliche IL-6-Rezeptoren. Die Signaltransduktion erfolgt über das Glykoprotein (gp) gp130, das ubiquitär auf allen Zellen exprimiert wird. Während der membranständige IL-6-R vor allem auf Immunzellen und Hepatozyten exprimiert wird, kann durch den löslichen IL-6-R auch eine Signaltransduktion in Zellen ohne membranständigem IL-6-R vermittelt werden. Die Bindung des IL-6/IL-6-R-Komplexes an gp130 führt zur Aktivierung von Janus-Kinasen und damit zur Phosphorylierung nachgeschalteter Signalproteine (33–35).

IL-6 spielt eine wesentliche Rolle bei der Differenzierung von BZ zu Plasmazellen und fördert die Immunglobulinproduktion (34,35,37). Die Expression von IL-6 wird durch transkriptionelle und posttranskriptionelle Mechanismen reguliert (37).

Eine übermäßige oder chronische IL-6-Produktion wird mit verschiedenen chronisch-entzündlichen Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen sowie malignen Erkrankungen assoziiert (33,35,37). Besonders in der Pathogenese der RA spielt IL-6 eine zentrale Rolle. Der IL-6-Spiegel im Serum und die Expression seiner Rezeptoren korreliert mit dem Ausmaß der Entzündung, klinischer Symptome und radiologischer Gelenkveränderungen (29). Als Regulator der Osteoklasten- und Osteoblastenaktivität fördert IL-6 die Knochenresorption, was zu subchondralen Erosionen und gelenkdestruierenden Prozessen führen kann (29,36). Die IL-6-induzierte Antikörperproduktion in Plasmazellen kann zur Hypergammaglobulinämie sowie zur Autoantikörperbildung führen (34,37).

IL-10 ist ein antiinflammatorisches, immunsuppressives Zytokin, das überschießende Entzündungsreaktionen sowie autoimmunvermittelte Prozesse herunterreguliert (24,40). Es spielt eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz, Begrenzung von Gewebeschäden, sowie Förderung der Wundheilung (40). Die antiinflammatorische Wirkung von IL-10 beruht auf der Hemmung der Expression kostimulatorischer Moleküle und proinflammatorischer Zytokine wie IL-1β und IL-6 durch Makrophagen und dendritische Zellen. IL-10 unterdrückt die Chemokinproduktion, die Immunzellrekrutierung, die Aktivität antigenpräsentierender Zellen und moduliert die Aktivität von TH-Zellen (40–47).

Auf BZ wirkt IL-10 antiapoptotisch, fördert den Klassenwechsel, sowie die Proliferation und Differenzierung zu Plasmazellen, was zu einer erhöhten Antikörperproduktion führt (40,46). IL-10 wird von verschiedenen Immunzelltypen produziert, darunter insbesondere TZ, BZ,

Makrophagen und dendritischen Zellen (40,45). Die Wirkung wird vermittelt über die Bindung an den IL-10-R, der Janus-Kinasen aktiviert und dadurch die Signaltransduktion über *STAT3* (*Signal transducer and activator of transcription 3)* induziert wird (48). Eine Dysregulation der IL-10-Produktion ist mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen und Infektionen assoziiert. Im Kontext der RA ist die Funktion von IL-10 oft reduziert, was zu einem ungleichgewichtigen Entzündungsprofil beitragen kann (46).

1.1.3 *Toll-like*-Rezeptoren & Pathogen-assoziierte molekulare Muster

Das angeborene Immunsystem spielt insbesondere beim Erstkontakt mit einem eindringenden Pathogen eine entscheidende Rolle. Die Erkennung dieser Pathogene erfolgt über sogenannte Mustererkennungsrezeptoren, zu denen unter anderem die Familie der TLRs (*Toll-like*-Rezeptoren) gehört. Diese erkennen und binden *PAMPs* und initiieren daraufhin eine angeborene Immunantwort. Die Einleitung der Immunreaktion erfolgt über die Aktivierung intrazellulärer Transkriptionsfaktoren und die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, Chemokine sowie die Expression kostimulatorischer Moleküle (49,50).

TLRs sind transmembrane Rezeptoren, die sowohl auf Immunzellen als auch auf nicht-immunologischen Zellen wie Epithelzellen und Fibroblasten exprimiert werden. Beim Menschen sind bislang zehn funktionelle TLRs beschrieben. Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer zellulären Lokalisation, entweder an der Zellmembran (TLR-1, -2, -4, -5, und -6) oder in endosomalen Kompartimenten (TRL3, -7, -8, and -9), sowie in ihrer Ligandenspezifität (50,51). Bezüglich der Ligandenspezifität ist bekannt, dass der TLR-2 bakterielle Lipoproteine grampositiver Bakterien erkennt; der TLR-4 bindet Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien; der TLR-3 erkennt doppelsträngige RNA (Ribonukleinsäure); TLR-7 und -8 erkennen einzelsträngige RNA und der TLR-9 erkennt unmethylierte CpG-Motive in bakterieller und viraler DNA (50,52). In der vorliegenden Arbeit liegt der Fokus auf TLR-9, der eine Schlüsselrolle bei der Erkennung pathogener DNA spielt.

CpG ist ein Dinukleotid bestehend aus Cytosin, das über ein Phosphat mit Guanin verbunden ist. In der DNA von Vertebraten und Bakterien unterscheiden sich CpG-Motive hinsichtlich ihres Methylierungsgrades, ihrer Position innerhalb der Basensequenz sowie ihrer Häufigkeit (53). Während in säugetiereischer DNA CpG-Dinukleotide selten und überwiegend methyliert vorliegen, sind sie in bakterieller DNA häufiger und zumeist unmethyliert vorhanden (52,54–56). Diese Unterschiede werden vom Immunsystem erkannt. Unmethylierte CpG-Motive wirken als *PAMPs* und aktivieren TLR-9. Auf BZ wird durch CpG eine TZ-unabhängige BZ-Aktivierung vermittelt (53,57).

Die Signalkaskaden induzieren unterschiedliche zelluläre Reaktionen, dazu zählen: BZ-Proliferation, Zytokinfreisetzung (unter anderem vom IL-4, IL-6, IL-10 und IL-12), Antikörperproduktion, Hochregulation von *MHC*-II und kostimulatorischer Molekülen, sowie Inhibition apoptotischer Signalwege (18,52,55,56). Der TLR-9 wird insbesondere auf naiven und Gedächtnis-BZ exprimiert und wird während der B-Zell-Aktivierung hochreguliert (18).

In **Abb. 1** ist die TLR-9-vermittelte Signalkaskade dargestellt, die durch CpG-Motive ausgelöst wird. Die Aktivierung des endosomal lokalisierten, transmembranen Rezeptors TLR-9 führt zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie *NF-κB* und AP-1 (Aktivierendes Protein 1), was wiederum die Expression und Freisetzung von Zytokinen wie IL-1, IL-6, TNF-*α,* IL-10 sowie die Sekretion polyreaktiver Immunglobulin (Ig)-M-Antikörper induziert (16,30,47–49).

In dieser Studie wurde CpG-B ODN 2006 verwendet, ein synthetischer Ligand, der gezielt den humanen TLR-9 auf B-Zellen aktiviert.

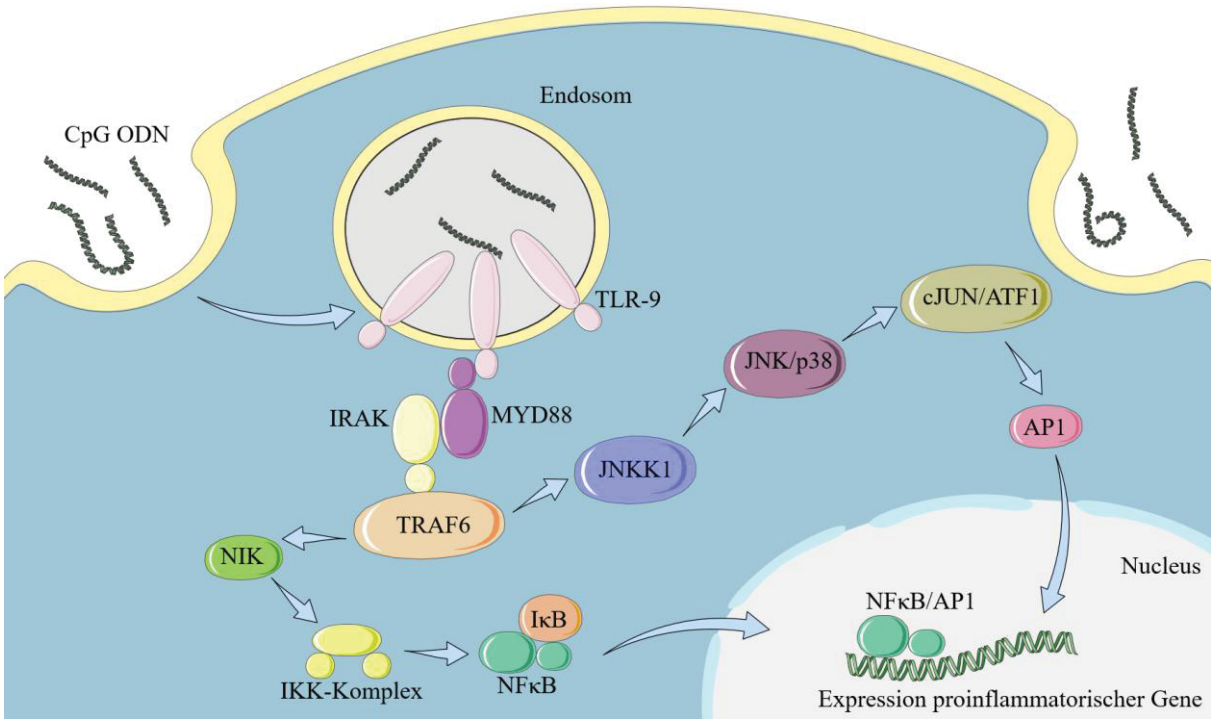


Abb. 1: CpG-induzierte Signaltransduktion am TLR-9 (57)
CpG-ODNs werden unter Beteiligung von PI3Ks endozytotisch aufgenommen und gelangen in das endosomale Kompartiment, wo der TLR-9 lokalisiert ist. Die Signaltransduktion erfolgt über die Interaktion von TLR-9 mit dem Adapterprotein *MYD88*. Nach Rekrutierung von IRAK wird TRAF6 durch Phosphorylierung aktiviert. Dies leitet zwei zentrale Signalkaskaden ein: Die Aktivierung der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK)-Kaskade über JNKK1 führt zur Aktivierung der MAP-Kinasen JNK und p38. Parallel wird der *IKK*-Komplex über NIK aktiviert, was zur Phosphorylierung und Degradation von IkB und damit zur Nuleotidtranslokation von *NFκB* führt. Die resultierende Aktivierung der Transkriptionsfaktoren *NF-κB* und AP1 induzieren die Expression verschiedener proinflammatorischer Gene, darunter Zytokine und kostimulatorische Moleküle.
AP1= Aktivierendes Protein 1; *IKK= Inhibiting-NF-κB-Kinase*; IRAK= Interleukin-1-Rezeptor-aktivierte Kinase; JNKK1= c-JUN N-terminale Kinase (JNK) Kinase-1; *MYD88= myeloide differentiation primary response gene 88; NFκB= Nuclear factor-κB*; *NIK= Nuclear factor-κB inducing Kinase*; ODN=Oligodinukleotid; PI3K= Phosphatidylinositol-3-Kinasen; TLR= Toll-like-Rezeptor; TRAF6= Tumor-Nekrosefaktor-Rezeptor-assoziierten Faktor 6.
Abbildung erstellt unter Verwendung und Modifizierung von Bildern von Servier Medical Art von Servier, lizenziert unter Creative Commons Attribution 3.0 Unported (https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

1.2 Rheumatoide Arthritis (RA)

Die RA ist eine systemische Autoimmunerkrankung, die durch eine chronisch-entzündliche Gelenkerkrankung mit fortschreitender Gelenkdestruktion gekennzeichnet ist. Zu den typischen pathologischen Veränderungen zählen Knorpelverlust, Knochenerosionen, hyperplastische Wucherung der Synovialmembran (Pannus-Bildung) sowie die Verengung des Gelenkspalts, was letztlich zu funktionellen Einschränkungen führt (29,49,60). Die Erkrankung ist typischerweise schubförmig und beginnt häufig an kleinen Gelenken und kann sich im Verlauf auf mehrere oder nahezu alle Gelenke ausdehnen (61). Neben der Gelenkbeteiligung sind auch extraartikulären Organmanifestationen möglich, etwa an Haut, Auge, Lunge oder Gefäßen (62). Die Ätiologie der RA ist multifaktoriell und umfasst genetische Prädispositionen, immunologische Dysregulationen sowie Umwelteinflüsse, darunter infektiöse Trigger und Nikotinkonsum (63).

Der pathophysiologische Entstehungsmechanismus der RA basiert auf einer Dysregulation des Immunsystems, die eine chronische Entzündung der Synovialmembran zur Folge hat (64). Im Rahmen der Interaktion zwischen der angeborenen und adaptiven Immunreaktion kommt es zur Infiltration und Akkumulation von Immunzellen im Synovialgewebe. Diese Zellen initiieren und unterhalten Prozesse, die zu Knorpel- und Knochenschädigung, sowie zur Pannusbildung führen. An diesen entzündlichen und destruktiven Veränderungen sind verschiedene Zelltypen wie Makrophagen, BZ, TZ, dendritische Zellen, Chondrozyten und Osteoklasten beteiligt (65).

Im Rahmen der entzündlichen Prozesse bei der RA kommt es durch die Interaktion von Immunzellen zu einer Überproduktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, TNF-α, IL-1β sowie verschiedener Chemokine. Gleichzeitig können Antikörper gegen körpereigene Antigene vermehrt detektiert werden. Diese Vorgänge fördern über die Rekrutierung und Aktivierung weiterer Immunzellen, insbesondere Leukozyten, die Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion sowie die Zerstörung der extrazellulären Matrix (46,60,61,64–68). Lokal im Gelenkgewebe sind unter anderem Fibroblasten einer der Hauptproduzenten für IL-6 (68).

IL-6 und TNF-α fördern die Expression von *VEGF* (*Vascular Endothelial Growth Factor*), einem zentralen Mediator der Angiogenese, der gleichzeitig eine erhöhte Gefäßpermeabilität induziert. Dies erleichtert Immunzellen das Eindringen in das entzündliche Gewebe (37,67,68). Darüber hinaus werden immunsupressive Immunzellen, wie regulatorische T-Zellen, durch TNF-α funktionell beeinträchtigt, wodurch die entzündliche Aktivität zusätzlich verstärkt wird (67). Makrophagen akkumulieren in der Synovialmembran und sezernieren nach Aktivierung eine Vielzahl proinflammatorischer Zytokine. TNF-α und IL-6 fördern dabei die Rekrutierung

von Leukozyten, während IL-8 gezielt neutrophile Granulozyten zum Entzündungsherd mobilisiert (60,69,70).

B-Zellen spielen ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der RA (16). Autoreaktive BZ entgehen dabei den zentralen und peripheren Kontrollmechanismen im Knochenmark sowie in den sekundären lymphatischen Organen. In der Folge können sich reife Plasmazellen entwickeln, die Autoantikörper produzieren (6,8,46,60). Bei der RA handelt es sich vorrangig um Rheumafaktoren, Auto-AK gegen das Fc-Fragment von IgG und AK gegen citrullinierte Proteine (ACPA) (60,64,68,71,72). Auto-AK-produzierende BZ finden sich in der Synovialmembran als auch im Blutkreislauf. Etwa 80 % der Patienten mit RA sind seropositiv für Rheumafaktoren, was mit aggressiveren Verlaufsformen, höheren Raten extraartikulärer Manifestationen sowie erhöhter Morbidität und Mortalität assoziiert ist (64,73).

Auto-AK wirken bei der RA proinflammatorisch und pathogen, unter anderem durch die Immobilisierung an Knorpeloberflächen, die Aktivierung neutrophiler Granulozyten und T-Zellen sowie die Bildung von Antigen-AK-Komplexen, die wiederum die Komplementkaskade aktivieren und die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Matrix-Metallo-Proteasen fördern (60,70,74–78). Zudem können Osteoklasten und Makrophagen durch Auto-AK-vermittelte TLR-Aktivierung und über die Bindung an Fc-Rezeptoren aktiviert werden (65). Autoreaktive BZ agieren zusätzlich als Antigen-präsentierende Zellen und können dadurch *CD*4+ TH-Zellen aktivieren (60,73,76,77).

Im Kontext der RA wurde in der Frühphase eine dysreguliert erhöhte IL-10-Genexpression beschrieben. Diese trägt zur Hyperaktivität der BZ bei, da durch IL-10 die Proliferation, der Klassenwechsel und die Differenzierung stimuliert wird (46). Insgesamt ist die Proliferation von B_{REG}, die eine immunsuppressive Funktion ausüben, bei Patienten mit RA vermindert (60,71).

IL-6 induziert die Differenzierung von BZ sowie die Produktion von Auto-AK und wirkt gemeinsam mit Zytokinen der Interleukin-1-Familie (unter anderem IL-1α, 1β, 18 und 33) aktivierend auf Endothelzellen, Osteoklasten, Fibroblasten und Chondrozyten (65,67,74,79,80). Diese Zelltypen tragen gemeinsam mit Makrophagen und Leukozyten wesentlich zur Bildung eines Synovialpannus bei, eines granulomatösen Gewebes, das in den Gelenkspalt hineinwächst. Der Pannus sezerniert Matrix-Metalloproteasen, welche zur Knorpeldestruktion führen und fördert gemeinsam mit Osteoklasten die Knochenresorption (29,64–66,68,70,74,79,81). Bei der RA sind insbesondere die MMP-1; -3; und -13 an diesen destruktiven Prozessen beteiligt. Ihre Expression wird durch proinflammatorische Zytokine wie TNF-α und IL-1, durch TLRs-Liganden sowie durch reaktive Sauerstoffspezies induziert (68).

Durch die AK-vermittelte Quervernetzung von Fc-Rezeptoren fusionieren Monozyten zu knochenabbauenden und -resorbierenden Osteoklasten. Gleichzeitig wird die Differenzierung von Osteoblasten gehemmt, was die Knochenneubildung einschränkt (29,60,77,82).

TLRs scheinen ebenfalls eine Rolle bei den entzündlichen und destruktiven Prozessen im Rahmen der RA zu spielen. In der Synovialmembran von RA-Patienten wurde eine Überexpression und gesteigerte Aktivität mehrerer TLRs, darunter TLR-2, -3, -5, -6, -7 und -9 nachgewiesen. Die Aktivierung dieser Rezeptoren fördert die Aufrechterhaltung eines proinflammatorischen Milieus (50). Endogene TLR-Liganden sind in der Lage Makrophagen über TLR-Signalkaskaden zu aktivieren. Besonders TLR-2 und TLR-4 wurden verstärkt auf Makrophagen in der Synovialmembran bei RA identifiziert (51). Die TLR-vermittelten Signalkaskaden, insbesondere über das Adaptorprotein *MYD88 (Myeloide differentiation primary response gene 88)*, scheinen eine entscheidende Rolle bei der Induktion von MMP zu spielen (50).

Zu den Therapieansätzen der RA zählen *disease-modifyinganti-rheumatic drugs* (*DMARDs*), nichtsteroidale antientzündliche Medikamente sowie Kortikosteroide (83,84). Darüber hinaus existieren mittlerweile verschiedene zielgerichtete immunmodulatorische Therapien, die gezielt in den pathophysiologischen Entstehungsprozess eingreifen. Dabei handelt es sich um biologische krankheitsmodifizierende Antirheumatika, die eine klinische Remission anstreben und Gelenksdestruktionen reduzieren sollen (29,83).

Etanercept, ein humanes, lösliches Fc-Fusionsprotein mit zwei IgG-Domänen wirkt als TNF-Rezeptor-Blocker. Tocilizumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen den IL-6-Rezeptor, der sowohl die Bindung von IL-6 an lösliche als auch membranständige Rezeptoren verhindert (23,24,29,37). Weitere therapeutisch eingesetzte Substanzen sind Infliximab und Adalimumab, beides Anti-TNF-AK; der IL-1-Rezpetorantagonist Anakinra sowie Abatacept, das die T-Zell-Aktivierung hemmt (46,83,85).

Die zentrale Rolle der BZ in RA wird auch durch therapeutische Ansätze wie die BZ-Depletionstherapie berücksichtigt. Rituximab, ein chimärer monoklonaler Antikörper gegen *CD*20, führt zu einer nahezu vollständigen Elimination von BZ im peripheren Blut und in der Synovialmembran (76,86,87). Da Pro-BZ und Plasmazellen *CD*20 nicht exprimieren, werden diese durch Rituximab nicht direkt eliminiert (76,86,88). Die Behandlung resultiert in einer reduzierten Konzentration zirkulierender Rheumafaktoren sowie einer verminderten TNF-α-Produktion (72,76,89).

1.3 Autonomes Nervensystem

Das Nervensystem wird in das zentrale (ZNS) und das periphere Nervensystem unterteilt. Letzteres gliedert sich in das sensorische, sensible und autonome Nervensystem. Das autonome Nervensystem wiederum besteht aus dem sympathischen (SNS) und parasympathischen Anteil, die antagonistisch und gleichzeitig komplementär wirken, um die Homöostase des Körpers aufrechtzuerhalten. Es reguliert lebenswichtige Körperfunktionen, die der unwillkürlichen Kontrolle unterliegen, darunter Herzfrequenz, Blutdruck, gastrointestinale Motilität und Körpertemperatur (1,62).

Das sympathische Nervensystem wird insbesondere in Stress- oder Gefahrensituationen aktiviert und bereitet den Organismus auf eine „*fight or flight*"-Reaktion vor (90,91). Dabei werden sensorische Informationen über die Sinnesorgane aufgenommen und über afferente Nervenfasern an das ZNS geleitet. Im Rückenmark erfolgt die erste Verschaltung und Weiterverarbeitung der Signale. Diese werden an das Großhirn zur kognitiven Bewertung, den Hirnstamm zur Steuerung vegetativer Funktionen wie Herzschlag, Atmung und der Reflexe sowie an das limbische System zur emotionalen Verarbeitung weitergeleitet.

Die zentrale Koordination erfolgt über den Hypothalamus, der als übergeordnetes Steuerzentrum die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHN-Achse) aktiviert und über das Rückenmark präganglionäre sympathische Nervenfasern stimuliert. Infolgedessen sezernieren postganglionäre sympathische Nervenendendigungen Norepinephrin (NE), während das Nebennierenmark Adrenalin und NE freisetzt. Parallel dazu wird über die HHN-Achse die Ausschüttung von Cortisol initiiert (1,92).

1.4 Katecholamine

Zu den körpereigenen Katecholaminen gehören Norepinephrin, Adrenalin und Dopamin. Diese fungieren als wichtige Neurotransmitter im peripheren und zentralen Nervensystem. Norepinephrin und Adrenalin wirken darüber hinaus als Stresshormone. Beide Substanzen spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulation des autonomen Nervensystems und beeinflussen unter anderem kardiovaskuläre Funktionen, Atemwegsreaktivität sowie den Energiestoffwechsels (93).

Der wichtigste Auslöser für die Freisetzung von Adrenalin und Norepinephrin ist eine Störung der physiologischen Homöostase, etwa infolge von psychischem oder physischem Stress oder körperlicher Belastung. Damit sind sie maßgeblich an der „*fight or flight*"-Reaktion beteiligt (93,94).

Katecholamine werden einerseits im ZNS als Neurotransmitter synthetisiert, andererseits im Nebennierenmark gebildet und dort als Hormone in den Blutkreislauf abgegeben. Ihre Wirkung an den Zielorganen wird über die Bindung an adrenerge Rezeptoren (ADRs) vermittelt, die zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (*GPCR*) gehören.

Das SNS setzt NE über postganglionäre sympathische Nervenfasern frei, während die Ausschüttung von Adrenalin nahezu ausschließlich über die Stimulation des Nebennierenmarks erfolgt (95).

1.4.1 Katecholaminsynthese und -Abbau

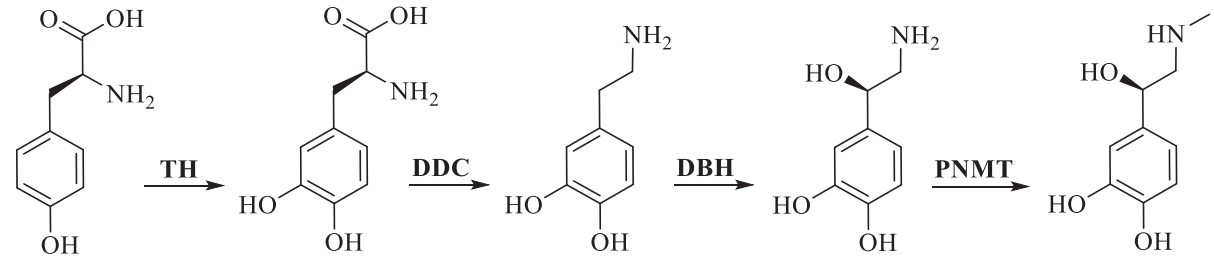


Abb. 2: Katecholamin-Biosynthese
DBH= Dopamin-*β*-Hydroxylase; DDC= DOPA-Decarboxylase; PNMT= Phenylethanolamin-N-Methyltransferase; TH= Tyrosinhydroxylase

Die Biosynthese der Katecholamine erfolgt enzymatisch ausgehend von der natürlichen Aminosäure L-Tyrosin (**Abb. 2**). Die Hydroxylierung zu L-DOPA wird durch die Tyrosinhydroxylase (TH), ein zytosolisches, nicht membrangebundenes Enzym, katalysiert (96–98). Da es sich hierbei um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Synthese handelt, unterliegt die Aktivität der TH verschiedenen regulatorischen Mechanismen (96).

Im peripherem und zentralen Nervensystem wird Dopamin nach der Decarboxylierung von L-DOPA durch den vesikulären Monoaminotransporter (VMAT) in synaptische Vesikel aufgenommen (97). Es existieren zwei Isoformen von VMATs mit unterschiedlicher Gewebeverteilung: VMAT1 wird primär in neuroendokrinen Zellen exprimiert, während VMAT2 bevorzugt im ZNS und sympathischen Neuronen vorkommt. In den Chromaffinzellen des Nebennierenmarks werden beide Transporter gemeinsam exprimiert.

Die Wiederaufnahme in Vesikel erfolgt über einen elektrochemischen Protonengradienten, der durch eine vesikuläre H+-ATPase aufrechterhalten wird. Die Monoaminwiederaufnahme erfolgt im Antiport gegen Protonen (99).

Innerhalb der Vesikel wird Dopamin durch *β*-Hydroxylierung zu NE und anschließend durch N-Methylierung zu Adrenalin umgesetzt (97,98). Die für die Methylierung verantwortliche PNMT (Phenylethanolamin-N-Methyltransferase) ist im Nebennierenmark in besonders hoher Konzentration vorhanden, da ihre Expression dort durch Cortisol induziert wird. In geringeren

Mengen ist PNMT auch in Neuronen des ZNS sowie in peripheren Geweben nachweisbar (100).

Der Kalziumeinstrom in die Zelle löst die Fusion der Vesikel mit der präsynaptischen Membran und somit die Freisetzung der Katecholamine in den synaptischen Spalt beziehungsweise in den Extrazellularraum aus, wodurch die Signalübertragung erfolgt. (96).

Die Wirkung der Katecholamine wird durch enzymatischen Abbau sowie durch ihre Wiederaufnahme in das Zytoplasma beziehungsweise in synaptische Vesikel begrenzt. Die Wiederaufnahme erfolgt über Na+/Cl-abhängige Transporter in der Plasmamembran, insbesondere über den Norepinephrin- (NET) und den Dopamintransporter (DAT). Der NET ist ein Symporter, an dem Noradrenalin sowie Natrium- und Chloridionen binden. Der für den Transport notwendige elektrochemische Natriumgradient wird durch die Aktivität einer Natrium-Kalium-ATPase aufrechterhalten (101,102).

Des Weiteren kann die katecholaminerge Wirkung durch enzymatischen Abbau beendet werden. Zwei Enzymgruppen sind hierbei entscheidend: Catechol-O-Methyltransferasen (COMT) und Monoaminooxidasen (MAO). Die COMT katalysiert die Methylierung und damit die Inaktivierung von Katecholaminen. Dieses Enzym ist ubiquitär vorhanden, wird jedoch besonders im Gehirn und in der Leber exprimiert (103).

Die MAO befindet sich auf der äußeren Mitochondrienmembran und inaktiviert Monoamine durch oxidative Desaminierung (104). Monoaminooxidasen existieren in zwei Isoformen: MAO-A und MAO-B, die sich in ihrer Substratspezifität unterscheiden. MAO-A hat eine höhere Affinität für Serotonin, Adrenalin und NE, während MAO-B bevorzugt Dopamin und Phenylethylamine abbaut (105).

Die COMT wandelt Dopamin zu 3-Methoxytyramin um, Noradrenalin und Adrenalin werden zu Normetanephrin beziehungsweise Metanephrin methyliert. Diese Zwischenmetabolite werden durch MAOs weiter zu den Endmetaboliten Vanillinmandelsäure bei NE und Adrenalin, beziehungsweise Homovanillinsäure bei Dopamin abgebaut (106).

1.4.2 Adrenerge Rezeptoren

Katecholamine entfalten ihre Wirkung durch Ligation an spezifische adrenerge Rezeptoren (Dopamin- und ADRs). Diese gehören zur Familie der *GPCR*. Wie alle *GPCRs* bestehen ADRs aus sieben Transmembrandomänen und lassen sich pharmakologisch und molekularbiologisch in die drei Hauptklassen α1-, α2- und β-ADRs einteilen. Diese unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Gewebeverteilung und Signaltransduktionsmechanismen (93,98,107). Jede dieser

Hauptklassen kann weiter in jeweils mehrere Subtypen untergliedert werden, die jeweils ähnliche Signaltransduktionswege aktivieren (93,98).

*GPCR*s sind über membranständige heterotrimere G-Proteine funktionell gekoppelt, welche aus einer α-, β- und γ-Untereinheit bestehen. Im inaktiven Zustand ist die α-Untereinheit an Guanosindiphosphat (GDP) gebunden, bei Aktivierung durch Ligandenbindung wird GDP durch Guanosintriphosphat (GTP) ersetzt (108). Dies führt zur Dissoziation des G-Proteins in die α-Untereinheit und den β-γ-Komplex. Beide Einheiten können anschließend intrazelluläre Signalwege aktivieren, indem sie mit spezifischen Effektoren interagieren. Zu den wichtigsten *Second Messengern* zählen das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP), Ca2+, Diacylglycerin und Inositoltriphosphat (98,107).

Adrenozeptoren sind dabei an unterschiedliche G-Protein-Subklassen gekoppelt: G_s stimuliert die cAMP-Produktion, G_i hemmt die Adenylatcyklase und G_q aktiviert die Phospholipase C-Signalkaskade. Über diese Signalwege werden zelluläre Informationen bis zum Zellkern weitergeleitet, wo durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren die Expression spezifischer Gene induziert wird, unter anderem solcher, die für Zytokine kodieren (98,109).

Rezeptoren der α1-Subgruppe sind an G_q-Proteine gekoppelt. Nach Ligandenbindung erfolgt die Aktivierung der Phospholipase C durch die GTP-gebundene Gα-Untereinheit. Phospholipase C spaltet das membrangebundene Phosphatidylinositolbiphosphat in Inositoltriphosphat und Diacylglycerin. Inositoltriphosphat ist wasserlöslich, diffundiert durch das Zytosol und vermittelt die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum. Diacylglycerin verbleibt als Lipid in der Plasmamembran und aktiviert dort die Proteinkinase C (PKC), welche unter anderem Ionenkanäle reguliert und weitere Proteine durch Phosphorylierung moduliert (109,110).

α1-ADRs lassen sich in die Subtypen α1A, α1B und α1D untergliedern, welche überwiegend postsynaptisch exprimiert werden. Diese Rezeptoren sind besonders im ZNS, im kardiovaskulären System sowie im Urogenitaltrakt lokalisiert. Funktionell vermitteln sie unter anderem die Vasokonstriktion peripherer Gefäße, beispielsweise in der Haut und im Gastrointestinaltrakt, sowie die Kontraktion glatter Muskulatur im Urogenitaltrakt (98,111–113).

α2-ADRs sind G_i-Protein-gekoppelt und inhibieren die Adenylatcyclase, wodurch die intrazelluläre cAMP-Konzentration reduziert wird. Im Gegensatz dazu sind β-ADRs klassisch an G_s-gekoppelt und aktivieren die Adenylatcyclase, die die Umwandlung von ATP (Adenosintriphosphat) zu cAMP katalysiert. Der Anstieg von cAMP aktiviert die

Proteinkinase A (PKA), welche durch Phosphorylierung zelluläre Zielproteine reguliert und dabei kontextabhängig auch die intrazelluläre Kalziumkonzentration beeinflusst (110,114).
Der α2-ADR lässt sich in die Subtypen α2A-, α2B- und α2C unterteilen. Diese vermitteln ihre Effekte vor allem im ZNS und im kardiovaskulären System (98,115). α2-ADRs induzieren unter anderem Hypotonie, Bradykardie und sedierende Effekte (116). Eine zentrale Funktion besteht in der Regulation der Neurotransmitterausschüttung. Insbesondere α2A- und α2C-ADRs fungieren als präsynaptische Autorezeptoren an noradrenergen Neuronen im ZNS und im peripheren Nervensystem (111,113,115,117–119). Alle drei Subtypen sind an präsynaptischen Membranen postganglionärer sympathischer Neuronen exprimiert und wirken negativ rückkoppelnd auf die Freisetzung von Katecholaminen (118).
β-ADRs lassen sich in die Subtypen β1, β2 und β3 unterteilen. β1-ADRs regulieren kardiale Funktionen durch eine Steigerung der Inotropie und Chronotropie, β2-ADRs vermitteln Vaso- und Bronchodilatation, während β3-ADRs durch Aktivierung der Lipolyse zur Energiebereitstellung in Stresssituationen beitragen (98,112,113,119).
Adrenerge Rezeptoren werden auch auf Immunzellen wie TZ, BZ und Makrophagen exprimiert (94,109). Dabei stellt der β2-Rezeptor den dominierenden Subtyp auf den meisten Immunzellen dar. Die adrenerge Signalübertragung in diesen Zellen beeinflusst die Immunantwort durch Modulation der Zytokinproduktion. Akut kann die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1β und TNF-α gefördert werden, während im chronischen Entzündungszustand häufig eine Verschiebung hin zu antiinflammatorischen Effekten, insbesondere durch IL-10-Hochregulation, beobachtet wird (94,98).
Die G-Protein-Kopplung adrenerger Rezeptoren kann im Verlauf zell- und kontextabhängig variieren. So sind β2-Rezeptoren in Lymphozyten primär G_s gekoppelt, können jedoch unter dem Einfluss von PKA-abhängiger Phosphorylierung von G_s zu G_i wechseln oder alternativ auch an G_q koppeln, was zu einer differenzierten immunregulatorischen Signalübertragung führt (94,109,120,121).

1.4.3 Katecholamine im Immunsystem

In der Literatur ist seit längerem bekannt, dass das SNS eine regulatorische Rolle bei Immunreaktionen spielt. Katecholamine fungieren dabei als zentrale Botenstoffe und stellen eine funktionelle Schnittstelle zwischen SNS und Immunsystem dar, um die Homöostase des Organismus aufrechtzuerhalten (94,98,107,109,122–125). Katecholamine, die entweder vom Nebennierenmark sezerniert oder von sympathischen Nervenendigungen freigesetzt werden, modulieren gezielt die Aktivität verschiedener Immunzellen. Darüber hinaus zeigten Studien,

dass Immunzellen selbst in der Lage sind, Katecholamine zu synthetisieren, um über auto- und parakrine Signalwege die Immunantwort zu beeinflussen (107,124). Die durch Katecholamine vermittelte Immunmodulation betrifft unter anderem die Proliferation, Zytokinproduktion und funktionelle Aktivität von Lymphozyten (109).

Adrenalin und NE entfalten ihre Wirkung über Bindung an α- und β-ADRs, die auf der Zellmembran von Immunzellen exprimiert werden. Das Ausmaß der ADR-Expression variiert dabei in Abhängigkeit vom Zelltyp und dem Aktivierungszustand der jeweiligen Zelle und wird durch Zytokine sowie Neurotransmitter dynamisch moduliert (98,107,126).

Zellen des angeborenen IS, wie Makrophagen, exprimieren sowohl α-als auch β-ADRs (62,125,127–129). Im Gegensatz dazu exprimieren BZ und TH1-Zellen primär den β2-ADR-Subtyp, während TH2-Zellen diesen weitgehend nicht exprimieren (62,125,130–132). Darüber hinaus konnte die Expression von α1-ADRs auf humanen *PBMC*s (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*), einschließlich Lymphozyten, nachgewiesen werden. Konkrete Aussagen zur spezifischen Expression auf humanen BZ stehen jedoch bislang noch aus (133–135). Untersuchungen an BZ aus der Milz von Mäusen zeigten hingegen, dass diese ebenfalls α-ADRs exprimieren (14).

Neben der Stimulation der ADRs durch extrazellulär freigesetzte Katecholamine konnte in Studien mit Mäusen gezeigt werden, dass sowohl T- als auch B-Lymphozyten die Enzyme TH und PNMT exprimieren und somit selbst zur Katecholaminsynthese befähigt sind (14,107,123,136,137). Besonders ausgeprägt war die Expression dabei in murinen B-Zellen, welche mittels Anti-IgM und CpG stimuliert wurden (14). Auch in humanen *PBMC*s, insbesondere in Lymphozyten konnten TH, NE und Adrenalin nachgewiesen werden (104,122,138–140). Die Expression von TH ist dabei in Phytohämagglutinin-stimulierten *PBMCs* im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant erhöht (139).

Darüber hinaus konnte auf der Plasmamembran von Maus-BZ und humanen *PBMC*s der NET detektiert werden, welcher die Aufnahme von Katecholaminen aus dem extrazellulären Raum ermöglicht (14,107). BZ sind zudem in der Lage, Katecholamine in Vesikeln zu speichern und bei Bedarf zu sezernieren, wodurch diese autokrin und/ oder parakrin auf Immunzellen wirken können. Dabei regulieren sie Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Lymphozyten (14,104,107,138). Die vesikuläre Speicherung erfolgt über die VMAT 1 und 2, welche den Transport von Katecholaminen aus dem Zytoplasma in sekretorische Vesikel vermitteln. Beide Transporter, ebenso wie der DAT und NET konnten in humanen und murinen Lymphozyten nachgewiesen werden. Ein Vergleich zwischen naiven und durch Anti-IgM/CpG

aktivierten murinen BZ ergab eine erhöhte Expression dieser Transportproteine nach Stimulation (14,141,142).

Neben den Transportern und anabolen Enzymen des Katecholamin-Stoffwechsels konnten in humanen *PBMCs* auch die katabolen Enzyme, insbesondere MAOs nachgewiesen werden (103,106, 143). Untersuchungen an Lymphozyten zeigten, dass vor allem die Isoform MAO-B in diesen Zellen exprimiert wird (105,143–146).

1.5 Bidirektionale Kommunikation zwischen Nervensystem und Immunsystem bei Entzündungen

Entzündungen stellen lokale, protektive Reaktionen des Organismus auf Gewebeschädigungen oder das Eindringen von Pathogenen dar. Sie erfordern eine fein abgestimmte Regulation, da eine überschießende als auch eine unzureichende Immunantwort mit Gewebeschäden einhergehen kann. In diesem Kontext übernimmt das Nervensystem eine zentrale regulatorische Funktion, indem es pro- und antiinflammatorische Signale kontinuierlich in einem dynamischen Gleichgewicht moduliert (90).

Die Kommunikation zwischen Nervensystem und Immunsystem erfolgt über zwei Hauptmechanismen. Zum einen geschieht dies systemisch über die Freisetzung hypothalamisch-hypophysärer Hormone mit nachgeschalteter Aktivierung der Nebenniere, zum anderen lokal über sympathische, parasympathische und sensorische Nervenfasern, die auch primäre und sekundäre lymphatische Organe innervieren (124–126,147–149).

Periphere Entzündungsreize, etwa durch körperfremde Antigene, aktivieren zunächst sensorische Nervenfasern, welche die Informationen an das ZNS weiterleiten. Dies führt zur Aktivierung des sympathischen Nervensystems sowie der HHN-Achse. In der Folge werden NE und Adrenalin aus dem Nebennierenmark sowie Kortisol aus der Nebennierenrinde freigesetzt (41,49,62,85,90,109,114,125,150).

Sowohl zirkulierende Hormone und Katecholamine als auch lokal freigesetztes Norepinephrin modulieren die Immunantwort, indem sie die Zytokinsekretion, die Antikörperproduktion sowie die Proliferation und Aktivierung von Immunzellen beeinflussen (41,85,91,124). Ziel dieser Mechanismen ist es, die Effektivität der Immunzellen gegen Pathogene zu steigern, die Wundheilung zu fördern und anschließend die Wiederherstellung der Homöostase zu ermöglichen (151).

Gleichzeitig können im Blut zirkulierende Zytokine wie IL-6, IL-1 und TNF-*a* die Blut-Hirn-Schranke überwinden und dort die Prostaglandinsynthese induzieren. Dies führt wiederum zur Aktivierung der HHN-Achse durch Freisetzung von

Corticotropin-*Releasing*-Hormon, welches über die Ausschüttung von ACTH (Adrenokortikotropes Hormon) aus der Hypophyse die Kortisolproduktion in der Nebennierenrinde stimuliert. Das immunsuppressiv wirkende Glukokortikoid stellt einen zentralen Bestandteil der systemischen Stressantwort dar. Zytokine stehen somit in einer bidirektionalen Wechselwirkung mit dem ZNS und modulieren dessen Aktivität (1,41,62,91,94,109,114,124,125,151–153).

Die systemische Aktivierung des SNS führt zu einer unspezifischen Verstärkung der Immunreaktion. Dies geschieht unter anderem durch eine Steigerung der Kreislauffunktion, etwa durch Erhöhung von Blutdruck und Herzfrequenz sowie durch einen gesteigerten Lymphflusses. Gleichzeitig werden Immunzellen aus dem Knochenmark mobilisiert, was deren Rekrutierung zum Entzündungsort erleichtert. Darüber hinaus trägt das SNS zur Umverteilung der Energiereserven zugunsten des Immunsystems bei, indem katabole Prozesse wie Lipolyse, Glykogenolyse und der Abbau von Muskelproteinen aktiviert werden. Charakteristisch für diese Phase der Immunantwort sind die Mobilisation von Leukozyten, die verstärkte Zytokin- und Antikörperproduktion sowie die effiziente Antigenaufnahme und -präsentation durch antigenpräsentierende Zellen (41,49,91,95,114,124,134,135,148,153).

Diese immunologischen Prozesse finden auch in sekundären lymphatischen Organen wie Milz und Lymphknoten statt. Dort werden Durchblutung und Lymphfluss gesteigert, was die Reifung, Aktivierung und Ausschüttung von B- und T-Lymphozyten fördert. Anschließend migrieren die Immunzellen entlang eines Chemokingradienten gezielt zum Entzündungsherd (91,95,114).

Am Ort der Entzündung setzen sympathische Nervenenden in unmittelbarer Nähe zu den Immunzellen den Neurotransmitter NE frei. Dabei können synapsenähnliche Kontaktstellen zwischen sympathischen Nervenfasern und Immunzelle entstehen. Für diese neuroimmunologische Kommunikation sind ADRs auf Immunzellen von zentraler Bedeutung. NE bindet an verschiedene ADR-Subtypen, entfaltet jedoch aufgrund des raschen enzymatisch Abbaus oder der Wiederaufnahme in Immunzellen beziehungsweise Neuronen nur eine kurzzeitige Wirkung (49,126,148). Immunzellen können mehrere ADR-Subtypen gleichzeitig exprimieren, wobei deren Expression im Verlauf des Entzündungsprozesses einer dynamischen Regulation unterliegt (114).

α-ADRs und β-ADRs unterscheiden sich in ihrer Bindungsaffinität für Katecholamine, wobei NE eine höhere Affinität zu α-ADRs aufweist (91,132,142,154–156).

Zusätzlich erfolgt eine auto- und parakrine Immunmodulation durch die Katecholaminproduktion der Immunzellen selbst. In der Nähe sympathischer Nervenfasern

oder katecholaminproduzierender TH+-Zellen entsteht eine hohe lokale Katecholaminkonzentration mit einem Konzentrationsgradient bedingt durch die Distanz zum Syntheseort. In Bereichen hoher NE-Konzentrationen werden bevorzugt β-ADRs aktiviert, was über eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels antiinflammatorische Prozesse induziert. In größerer Entfernung dominieren aufgrund der höheren Rezeptoraffinität α-adrenerg vermittelte Effekte, die typischerweise mit einer Hemmung der cAMP-Bildung und der Aktivierung proinflammatorische Signalwege assoziiert sind (62,91,95,114,131,151,153,157). Proinflammatorische Effekte der α-adrenergen Rezeptoraktivieren umfassen unter anderem die verstärkte Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies in Makrophagen sowie eine gesteigerte TNF-α-Expression (62,91,142,148,157,158). Demgegenüber vermitteln β2-ADRs überwiegend antiinflammatorische Wirkungen, etwa durch Induktion der IL-10-Produktion und die Hemmung proinflammatorischer Zytokine wie TNF-α oder IL-12 (62,91,109,124,129,142,148,157,159,160).

Immunzellen, die sowohl α- als auch β-adrenerge Rezeptoren exprimieren, sind somit in der Lage, pro- als auch antientzündliche Prozesse flexibel zu regulieren (91,129,159). Die Expression dieser Rezeptoren sowie die nachgeschalteten Signalkaskaden werden durch den Aktivierungszustand der Zelle, durch Zytokine, Hormone und Neurotransmitter sowie durch Ligandenbindung und Rezeptoraffinität beeinflusst (91,114,129).

Im Verlauf einer Entzündung verschiebt sich die Signaltransduktionen tendenziell von β-adrenerg vermittelten antiinflammatorischen hin zu α-adrenerg vermittelten proinflammatorischen Signalwegen (91,95,114,161).

Der Entzündungsverlauf wird dabei nicht nur durch die Rezeptorexpression auf Immunzellen, sondern auch durch lokale Katecholaminkonzentrationen bestimmt, welche wiederum von der Dichte sympathischer Nervenfasern im betroffenen Gewebe abhängen (49,91,162).

Zu Beginn einer Entzündung ist die sympathische Innervation hoch und von den Nervenendigungen freigesetztes NE vermittelt sowohl antiinflammatorische Effekte über β-ADRs als auch proinflammatorische Signale über α-ADRs zur effektiven Pathogenabwehr (91). Mit Fortschreiten der Entzündung nimmt die Dichte der NE-sezernierenden sympathischen Nervenfasern lokal ab, wodurch die Katecholaminkonzentration sinkt und α-adrenerg vermittelte Effekte relativ dominieren. Kompensatorisch steigt in späteren Entzündungsphasen die Anzahl katecholaminproduzierender Immunzellen am Entzündungsort an, um den Rückgang der neuronalen Katecholaminquelle auszugleichen (41,91,95,114,156). Zusätzlich nimmt die sensorische Innervation zu, wobei sensorische Nervenfasern

Neuropeptide wie Substanzt P freisetzen, die die lokale Entzündungsreaktion weiter verstärken (41,91,95).

Auf systemischer Ebene bleibt die Aktivität des Sympathikus erhöht, um grundlegende Körperfunktionen wie Energiebereitstellung und Blutdruckregulation aufrechtzuerhalten. Persistiert dieser Zustand jedoch chronisch, kann die dauerhafte Aktivierung des SNS und der HHN-Achse zu katabolen Schäden des Organismus führen (91,95,114).

Neben Immunzellen interagiert das SNS auch mit weiteren Zelltypen wie Endothelzellen oder Fibroblasten, die über ihre Zytokinproduktion, insbesondere IL-6, ebenfalls zur Immunmodulation beitragen. (91). Die zirkulierende IL-6-Konzentration dient dabei als Marker zur Unterscheidung zwischen lokal begrenzter oder systemischer Inflammation (95). Zudem inhibieren proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-2, IL-6 und TNF-α die präsynaptische Freisetzung NE und regulieren auf diese Weise indirekt ihre eigene Produktion (150).

Kann ein Pathogen frühzeitig eliminiert werden, sind diese Anpassungsprozesse nicht länger erforderlich und die Aktivität des SNS sowie der HHN-Achse kann wieder herunterreguliert werden (153).

1.6 Einfluss zwischen autonomem Nervensystem und Immunsystem bei RA

Die multifaktoriellen Ursachen der RA sind bislang nicht vollständig geklärt. Zunehmende Evidenz deutet jedoch darauf hin, dass neuroimmunologische Dysregulationen, insbesondere des autonomen Nervensystems, eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Erkrankung spielen (62,163–165).

Da es sich bei der RA um eine Autoimmunerkrankung handelt, befindet sich der Organismus in einem Zustand persistierender, chronischer Inflammation. In diesem Kontext bleibt die systemische Aktivität des SNS dauerhaft erhöht (91,114). Im Gegensatz zu akuten Infektionen, bei denen körperfremde Pathogene erfolgreich eliminiert werden können, richtet sich die Immunantwort bei der RA gegen körpereigene Autoantigene. Diese können vom Immunsystem nicht beseitige werden, was zu einer anhaltenden lokalen Entzündungsreaktion führt. Zur Aufrechterhaltung dieser chronischen Inflammation werden zusätzliche immunmodulatorische Mechanismen aktiviert, die den Entzündungsprozess weiter fördern.

Chronisch entzündliche Veränderungen des Synovialgewebes gehen mit einer reduzierten Dichte sympathischer Nervenfaserdichte einher (91,95,98,114,142,153,157,165–167). Ob diese neuronale Reorganisation ursächlich zur Entzündungsentstehung oder eine Folge der chronischen Inflammation darstellt, ist bislang nicht abschließend geklärt (95). Kompensatorisch nimmt im Verlauf der Erkrankung die Anzahl TH+-Immunzellen in

lymphatischen Organen wie Lymphkonten, und Milz sowie und im Gelenkgewebe zu. Auch nicht-immunologische Zellen, darunter Fibroblasten, zeigen eine gesteigerte Katecholaminproduktion (91,114,142,153,157,162,165,168). Im Synovialgewebe von RA-Patienten konnte eine erhöhte Dichte *CD*19+/TH+ BZ nachgewiesen werden, während ein entsprechender Anstieg im peripheren Blut nicht beobachtet wurde (142,156,157,168). Diese lokal wirkenden Zellen tragen vermutlich zur immunsuppressiven Modulation der Entzündungsreaktion bei (114). Darüber hinaus besteht ein Zusammenhang zwischen der Aktivität von TH+-Zellen und den hypoxischen Bedingungen im entzündeten Gelenk, einem charakteristischen Merkmal des RA-Synoviums (168).

Mit fortschreitender Erkrankung verschiebt sich die adrenergen Signaltransduktion von *β*- zu *α*-adrenerg vermittelten Prozessen (95,114,166,169). Zytokine wie IL-2 modulieren dabei die Expression von *β*2-ADRs auf Lymphozyten (62,164). Studien zur juvenilen RA zeigen zudem eine erhöhte Expression von *α*1-ADRs (127,170). Die Aktivierung von *α*-ADRs führen unter anderem zur Stimulation der PKC und von mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) und damit von Signalwegen, die wesentlich an der Proliferation synovialer Fibroblasten beteiligt sind (98).

Auf *PBMC*s, insbesondere T- und B-Zellen von RA-Patienten, wurde zudem eine verminderte Dichte sowie Affinität von *β*2-ADRs beschrieben. Diese Desensibilisierung und Herunterregulation resultiert aus einer chronischen Rezeptorstimulation. Die Desensibilisierung erfolgt über die Phosphorylierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren und wird durch inflammatorische Signale reguliert. Aufgrund der Kopplung des *β*2-ADR an G_s-Proteine führt dessen Herunterregulation zu einer verminderten intrazellulären cAMP-Produktion, wodurch proinflammatorische Signalwege überwiegen (58,94,95,98,114,151,164,165,171,172). Charakteristisch für dieses Milieu ist eine verstärkte Sekretion proinflammatorischer Zytokinen wie IL-6 und INF-γ, die zur Progression der Entzündung und zur Gewebeschädigung beitragen (62,94,149,163,173).

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass es im Verlauf chronischer Entzündungsprozesse zu veränderten intrazellulären Signalkaskaden nach adrenerger Rezeptorstimulation kommen kann und dass die Immunmodulation nicht ausschließlich über die klassischen G-Protein-vermittelten Signalwege erfolgt. So konnte ein Wechsel der G-Protein-Kopplung des *β*2-ADR von $G\alpha_s$ zu $G\alpha_i$ beobachtet werden. Diese Verschiebung wird vermutlich durch die PKA-vermittelte Phosphorylierung des Rezeptors verursacht, welche dessen Affinität für $G\alpha_s$ reduziert. Ein solcher veränderter Kopplungszustand wurde unter anderem in Synovialzellen von RA-Patienten nachgewiesen (16,132,151,174).

Tierexperimentelle Studien im Kollagen-induzierten-Arthritis (CIA)-Modell, ein etabliertes Mausmodell der humanen RA, zeigen, dass es im chronischen Stadium der Erkrankung zu einer zunehmenden Verlagerung der β2-ARD-Signaltransduktion hin zur MAPK-anhängigen Signalwegen (*ERK* (*extracellular signal regulated kinase*), p38) kommt, während der klassische cAMP/*CREB* (*cAMP response element-binding protein*)-Signalweg in den Hintergrund tritt. Eine verstärkte Rezeptorphosphorylierung, welche durch unter anderem PKA oder PKC bedingt wird, fördert die Bindung von β-Arrestinen an dem intrazellulären Rezeptorbereich. Neben ihrer Rolle bei der Desensibilisierung und Internalisierung des Rezeptors fungieren β-Arrestine als Signaladapter, die MAP-Kinasen aktivieren und so über die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren alternative, häufig proinflammatorische Signalkaskaden initiieren (41,109,114,151,153,174).

Zusammenfassend zeigt das SNS in der Frühphase der Arthritis überwiegend proinflammatorische Effekte, unter anderem durch verstärkte Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 sowie in der Rekrutierung von Immunzellen ins entzündliche Gewebe.

Die lokale kompensatorische Katecholaminsynthese durch Immunzellen reicht im Verlauf jedoch nicht aus, um den chronischen Entzündungsstatus zu unterdrücken. Somit konnte im Stadium der etablierten Arthritis eine Zunahme der β2-ADR-exprimierenden BZ, sogenannte $B_{REG,}$ festgestellt werden, welche IL-10-fördernde, antiinflammatorische Signalwege vermitteln (91,114,153,165,168,174,175). Die dynamische Regulation der β2-ADR-Expression und -Signaltransduktion könnte somit wesentlich zur Verschiebung von pro- hin zu antiinflammatorischen sympathischen Effekten beitragen (41,151,153,174). Insgesamt ist die IL-10-Produktion von BZ von Patientin mit RA jedoch im Vergleich zu Gesunden weiterhin vermindert (16,87).

Die für die Immunmodulation relevanten Katecholamine sind Adrenalin und NE. Adrenalin zeigt einen insgesamt geringeren Einfluss auf die chronische Entzündungsreaktion. Bei RA-Patientin bleiben die Adrenalinspiegel entweder unverändert oder sogar vermindert. Aufgrund seiner hohen Affinität zu β-ADRs und der damit verbundenen immunsuppressiven Wirkung bleibt Adrenalin jedoch weiterhin relevant. Eine weitere Reduktion seiner Konzentration könnte die entzündliche Aktivität zusätzlich begünstigen (153).

Therapeutische Ansätze könnten auf die Korrektur sympathovagaler Dysbalance abzielen, etwa durch Reduktion der systemischen sympathischen Aktivität und gleichzeitige Stimulation des Parasympathikus (unter anderem über den Nervus vagus) (114,153). Die gezielte Modulation adrenerger Signalwege, wie die Antagonisierung von α1-ADRs und die Stimulation von β2-ADRs kann intrazelluläres cAMP erhöhen und antiinflammatorische Effekte fördern. Auch

das in der RA-Therapie etablierte Methotrexat wirkt unter anderem über eine Erhöhung von cAMP. Darüber hinaus führen MAO-A- und MAO-B-Hemmer durch die Hemmung des Katecholaminabbaus zu einem Anstieg der verfügbaren Neurotransmitter und somit ebenfalls zu einer Erhöhung von cAMP (91,114,132,174).

Zur Untersuchung dieser Effekte wurde unter anderem das Modell der Kollagen-induzierten Arthritis eingesetzt. In diesem Krankheitsmodell zeigt sich eine phasenspezifische Wirkung des SNS, ähnlich der RA. Während der Induktions- und asymptomatischen Frühphase überwiegen proinflammatorische Effekte infolge sympathischer Dysregulation. In der Spätphase hingegen entfaltet das SNS zunehmend antiinflammatorische Wirkungen (41,176,177). In der CIA konnte gezeigt werden, dass β-ADR-Agonisten Entzündungsreaktionen reduzieren (156,178). Demgegenüber ist die Aktivierung des $\alpha 1/G_i$-Signalwegs mit einer erhöhten Produktion proinflammatorischer Zytokine, insbesondere IL-6 verbunden. IL-6-Knockout-Mäuse waren vollständig gegen die Entwicklung einer CIA geschützt (79).

Komplementär könnte eine Steigerung der IL-10 Produktion zur Verbesserung einer Arthritis beitragen. In CIA-Studien reduzierten injizierte BZ aus immunisierten Wildtyp-Mäusen die Entzündung über IL-10, BZ aus IL-10-Knockout-Mäusen zeigten keinen Effekt. (179). Auch während der Aktivierungsphase der CIA ließ sich ein Sympathikus-vermittelter Anstieg der IL-10-Produktion in *CD*19+, murinen BZ der Milz beobachten. BZ von sympathtektomierten Mäusen produzierten signifikant weniger IL-10 (41,180).

In humanen und tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass der Zeitpunkt einer Sympathektomie entscheidend für den Verlauf der RA beziehungsweise CIA ist (91). Insbesondere eine frühzeitige Sympathektomie im CIA-Modell war mit einer abgeschwächten Krankheitsausprägung verbunden. Demgegenüber führte eine SNS-Depletion in der chronischen Phase zu einer verstärkten Krankheitsaktivität, was mit dem Verlust von TH+-Zellen im entzündlichen Gewebe assoziiert war. Diese Ergebnisse verdeutlichen den phasenabhängigen Effekt des SNS: proinflammatorisch in der Initialphase der Erkrankung, antiinflammatorisch in der chronischen Phase (85,91,95,165,175,176).

Auch eine gesteigerte NE-Produktion in Immunzellen fördert β2-ADR-vermittelte antiinflammatorische Signalwege. Im CIA-Modell konnte eine zunehmende TH-Expression im direkten Zusammenhang mit einer verstärkter IL-10-Produktion und einer klinischen Verbesserung dargestellt werden. Umgekehrt führte eine Hemmung der TH zu einer Reduktion der IL-10-Produktion bei gleichzeitigem Anstieg der TNF-Synthese (14,168).

Über den TLR-9-Signalweg kann ebenfalls die TH-Expression in BZ erhöht und deren Differenzierung zu B_{REG} gefördert werden (14). Diese Zellen sind in der späten Phase der RA

von besonderer Bedeutung, da sie unter β-ADR-Stimulation vermehrt IL-10 produzieren, was eine protektive und antiinflammatorische Wirkung entfaltet und vom therapeutischem Nutzen sein könnte (14,87).

Zusammenfassend spielen Katecholamine eine zentrale Rolle in der Kommunikation zwischen SNS und dem Immunsystem. Dies eröffnet neue therapeutische Ansatzpunkte zur Modulation chronischer Inflammation, insbesondere durch TLR-9-aktivierte, IL-10-produzierende B_{REG}-Zellen, die im Rahmen dieser Arbeit im Fokus stehen.

1.7 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit soll der adrenerge Einfluss auf isolierte humane *CD*19+ BZ gesunder erwachsener Probanden untersucht werden. Dabei werden sowohl naive BZ als auch BZ nach TZ-unabhängiger Stimulation mit dem TLR-9-Agonisten CpG eingesetzt.

Zunächst soll mittels Durchflusszytometrie die Expression adrenerger Rezeptoren, sowohl intrazellulär als auch auf der Zelloberfläche, in naiven und CpG-stimulierten BZ nachgewiesen und statistisch ausgewertet werden.

Anschließend wird die Expression essenzieller Proteine der Katecholaminsynthese und des Katecholaminmetabolismus unter dem Einfluss der TLR-9-Aktivierung untersucht und mit der Expression in naiven BZ verglichen. Im Fokus stehen dabei die für die Synthese erforderliche TH, die Katecholamintransporter für Norepinephrin und Dopamin sowie die Katecholamin-abbauenden Enzyme MAO-A und MAO-B.

Die entzündungsmodulierende Funktion adrenerger Rezeptoren soll nach deren Stimulation mit spezifischen Liganden für die jeweiligen ADR-Subtypen untersucht werden. Hierbei wird die Konzentration der produzierten proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF-α sowie des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 mittels *ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)* bestimmt.

Ein vertieftes Verständnis des adrenergen Einflusses auf die Immunantwort könnte dazu beitragen, pathologische Prozesse bei Autoimmunerkrankungen wie der RA besser zu verstehen und potenziell neue therapeutische Ansatzpunkte zu identifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Angaben zu den Proband-/innen & Aktenzeichen des Ethikvotums

Für die Untersuchung der Funktions- und Regulationsmechanismen von *CD*19+ BZ wurden Blutproben als Untersuchungsmaterial benötigt. Diese wurden von volljährigen Spendern nach ausführlicher Aufklärung über die Entnahme und Verwendung der Blutprobe und schriftlicher Einwilligung entnommen. Die Probanden waren bei allgemeiner Gesundheit und anamnestisch lagen keine immunologischen Krankheitsbilder vor. Die entnommenen Blutproben wurde mit einer Identifizierungsnummer verschlüsselt, sodass personenbezogene Daten für die Versuchsdurchführung pseudonymisiert vorlagen. Für die Untersuchung des Einflusses auf und die Produktion von Entzündungsmediatoren durch Immunzellen lag von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität ein positives Votum vor. Die Studiennummer lautet: 2018-296-KFogU.
Der Mittelwert des Alters der insgesamt 10 männlichen und 6 weiblichen Probanden lag bei 29 Jahren, der Median bei 25 Jahren. Genauere Angaben zum Alter und zum Geschlecht der Blutspender sind **Tabelle 1** zu entnehmen.

Spendernummer	Geschlecht	Alter (Jahre)
1	Weiblich	23, 24
2	Männlich	23
3	Weiblich	23
4	Weiblich	22
5	Weiblich	25
6	Männlich	27
7	Männlich	20, 21
8	Männlich	23
9	Männlich	29, 30
10	Weiblich	47
11	Männlich	45
12	Männlich	29
13	Männlich	34
14	Männlich	23
15	Weiblich	45
16	Männlich	42

Tabelle 1: Daten zu den Blutspendern
Auflistung der Probanden mit Geschlecht und Alter in Jahren am Tag der Blutabnahme. Sind zwei Zahlen in der Spalter zum Alter angegeben, bedeutet dies, dass der Probend im Laufe des Projektes Geburtstag hatte und dass mehrere Blutabnahmen, sowohl vor als auch nach dem Geburtstag erfolgten.

2.2 Material

Alle verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Reagenzien, Medien, Medienzusätze, Antikörper, Kits und Software sind in **Tabelle 2** bis **Tabelle 7** jeweils unter Angabe des Herstellers dargestellt.

2.2.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Laborgeräte	Hersteller
- **Abzug *Secuflow***	Waldner, Wangen im Allgäu, DEU
- **Analysewaage KERN ABT 120-5DM**	Kern und Sohn GmbH, Balingen, DEU
- **Aspirator**	STARLAB GmbH, Hamburg, DEU
- **Aspirator FTA-1**	Grant Instruments Europe B.V., Amsterdam, NL
- **Autoklav Systec VX-55**	Systec GmbH, Linden, DEU
- **Blockthermostat BT 100**	Kleinfeld Labortechnik GmbH, Gehrden, DEU
- **ChemiDoc™ MP *Imaging System*** - **Mini-PROTEAN® *Tetra Cell*** - **Plattenlesegerät iMark®** - **PowerPac™ *Basic Power Supply*** - **Trans-Blot® Turbo™ Transfer System** - **Zellzähler TC20™**	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
- **CO_2-Inkubator CB 170 E7**	BINDER GmbH, Tuttlingen, DEU
- **Dispensette® III Analog, 0,5-5 ml** - **Mehrkanalpipette Transferpette® S-8**	BRAND GmbH + Co. Kg, Wertheim, DEU
- **Durchflusszytometer MACSQuant® *Analyzer* 10** - **MACS® MultiStand** - **Separator OctoMACS™ und QuadroMACS™**	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DEU
- **Eismaschine 151117**	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen, DEU
- **Eppendorf Research® plus Einkanalpipette und Mehrkanalpipette** - **Eppendorf Xplorer® plus, Elektrische Mehrkanalpipette: 16 und 8 Kanäle**	Eppendorf AG, Hamburg, DEU
- **FastGene® Minizentrifuge NG002B**	Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, DEU
- **Hochgeschwindigkeits-Mikrozentrifugen CT15RE**	VWR International GmbH, Darmstadt, DEU
- **LSE Digitaler Mikrotiterplattenschüttler**	Corning, Corning, NW, USA
- **Magnetrührer IKAMAG® RET**	IKA- Werke, Staufen im Breisgau, DEU
- **Pipettierhilfe Pipetus®**	Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt; DEU
- **Plattenlesegerät Infinite® M200 PRO**	Tecan Group AG, Männedorf, CHE
- **Tubenroller RS-TR05**	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, DEU
- **Ultraschallprozessor UP50H**	Hielscher Ultrasonic GmbH, Teltow, DEU
- **Vornado™ Mini Vortex Mixer**	Benchmark Scientific, Sayreville, NJ, USA
- **Vortex REAX 2000**	Heidolph Instruments, Schwabach, DEU
- **Wasserbad 3042**	Köttermann GmbH, Uetze, DEU
- **Werkbank CA/REV 6**	Clean Air Technik, Woerden, NLD
- **Zentrifuge Rotina 420R**	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, DEU

Tabelle 2: Verwendete Laborgeräte mit Angaben zum Hersteller

Material	Hersteller
- **8-Kanal-Pipettiereinheit, PP** - **Polyesterfolie für Mikroplatten, unsteril** - **Reagenzreservoirs, PP**	VWR International GmbH, Darmstadt, DEU
- **8-Well *PCR Tube Strips* 0.2 ml**	Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, DEU
- **96-*Deep*-Well Mikroplatte** - **96-Well, PS, Suspensionskultur-Mikroplatte, transparent, steril**	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DEU

- **Leucosep™ Röhrchen, 50ml, Trennscheibe, natur, steril, konischer Boden** - **Mikroplatte 96 Well, PS, transparent, unsteril F-Boden und U-Boden** - **Mikroplatte, 384 Well, PS, transparent, steril F-Boden, *high binding*** - **Reaktionsgefäß, 5 ml, PP, natur, mit angehängtem Deckel, graduiert, steril** - **Röhrchen, PP, CELLSTAR®, konischer Boden, natur, steril, 15 ml und 50 ml** - **Suspensionskulturflasche CELLSTAR®, 50 ml, PS, transparent, steril**	
- ***Blotting*-Filterpapiere, 2.5-mm Dicke, 7.5 x 8.4 cm** - **Thermo Scientific™, nicht sterile Immuno 96-Well-Platte mit durchsichtigem flachem Boden**	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
- **Corning® Costar® Stripette® Serologische Pipette, steril**	Corning incorporated, Corning, NY, USA
- **Filterspitzen TipOne®, graduiert, natur, steril** - **Pipettenspitzen TipOne®, graduiert, natur, unsteril**	STARLAB GmbH, Hamburg, DEU
- **Gel Releasers** - **Mini-PROTEAN® TGX™ Stain-Free™ Gele, 4-15 %, 15-Well-Kamm, 15 µl** - **Nitrocellulose-Membran, 0,2 µm** - **Zellzähler-Objektträger für TC10™/TC20™-Zellzähler, Doppelkammer**	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
- **Glaspasteurpipetten 225 mm**	BRAND GmbH + Co. Kg, Wertheim, DEU
- **MS-Säule; LS-Säule** - ***Pre*-Separations-Filter 30µm**	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DEU
- **Pipettenspitzen epT.I.P.S.® farblos** - **Safe-Lock Eppendorf Tubes®, farblos**	Eppendorf AG, Hamburg, DEU
- **Pipettenspitzen SurPhob®, farblos, steril**	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DEU
- **Vacutainer® Safety-Lok™ Blutabnahmeset 21 G** - **Vacutainer® Einmalkanülenhalter** - **Vacutainer® K2-EDTA-Röhrchen 10 ml**	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA

Tabelle 3: Verwendetes Verbrauchsmaterial mit Angaben zum Hersteller
PP: Polypropylen; PS: Polysterol

2.2.2 Chemikalien, Reagenzien, Medien und Medienzusätze

Chemikalien, Reagenzien, Medien, Medienzusätze	Hersteller
- **(−)-Isoproterenol -Hydrochlorid** - **BRL 37344 Natriumsalzhydrat** - ***Bovine Serum Albumin*** - **Carbonate-Bicarbonate Puffer, Kapsel** - **Dulbecco´s Phosphatgepufferte Kochsalzlösung** - **Gibco™ HEPES Lösung** - **L-(-)-Norepinephrin-(+)-bitartratsalz Monohydrat, >99 %** - **Nadolol** - **Deoxycholsäure Natriumsalz** - **Natriumpyruvat-Lösung, steril** - **Penicillin-Streptomycin** - **Titripur® Schwefelsäure** - **Trypanblau Lösung** - **Tween® 20**	Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA
- **1-Step™ Ultra TMB-ELISA** - **Gibco™ *Fetal Bovine Serum*, qualifiziert, hitzeinaktiviert** - **Gibco™ GlutaMAX™ (100x)** - **Gibco™ *PBS*, pH 7,4 (10x)**	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA; USA

- **2-Mercaptoethanol**	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
- **Ampuwa® Spüllösung Plastipur®**	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, DEU
- **autoMACS® *Running Buffer*-MACS® *Separation Buffer*** - **MACSQuant® *Running Buffer*** - **MACSQuant®/MACSima™ *Storage Solution*** - **MACSQuant® *Washing Solution*** - ***Red Blood Cell Lysis Solution* (10x)**	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DEU
- ***Blotting-Grade* Blocker*, Nonfat dry milk***	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
- **Bromphenolblau Natriumsalz** - **Desoxycholsäure Natriumsalz (DOC)** - **Glycerin ROTIPURAN® ≥99,5 %, *p.a.*, wasserfrei** - **Glycin PUFFERAN®, >9bri9 %, *p.a.*** - **Natriumchlorid, ≥99,5 %, *p.a.*** - **ROTI®-Mark WESTERN PLUS Protein-Marker**	Carl Roth GmbH &Co KG, Karlsruhe, DEU
- **CL-316,243 Natriumsalz**	Cayman, Ann Arbor, MI, USA
- **Class B CpG Oligonukleotid, Humaner TLR9-Ligand ODN 2006 (ODN 7909)**	InvivoGen, San Diego, CA, USA
- **cOmplete™ Mini, EDTA-freier Protease-Inhibitor-Cocktail Tabletten** - **PhosSTOP™ Tabletten**	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DEU
- **Demineralisiertes Wasser**	Otto Fischer GmbH & Co KG, Saarbrücken, DEU
- **Dexmedetomidine Hydrochlorid** - **Doxazosin Mesylat** - **ICI 118,551 Hydrochlorid** - **L-748,337** - **(R)-(-)-Phenylephrine Hydrochlorid** - **RS 79948 Hydrochlorid**	Tocris Bioscience, Bristol, UK
- **Fixations-Puffer BD Cytofix™**	BD GmbH, Heidelberg, DEU
- **Immobilon® Forte Western *HRP*-Substrat** - **Methanol *for analysis* EMPARTA® ACS** - **Tris Base, *Molecular Biology Grade*** - **Tris, Hydrochlorid, *Molecular Biology Grade***	Merck Millipore, Burlington, MA, USA
- **LymphoPrep™**	Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg, DEU
- **Nonidet P-40 Assay Reagent (10%)**	Biomol GmbH, Hamburg, DEU
- **PRMI 1640 Medium *w/o* Phenolrot (mit 2.0 g/l NaHCO3, *w/o* L-Glutamine)**	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, DEU
- ***Sodium dodecyl sulfate* (*SDS*) ≥99% für die Molekularbiologie**	VWR International GmbH, Darmstadt, DEU

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien, Reagenzien, Medien und Medienzusätze mit Angaben zum Hersteller
TMB= Tetramethylbenzidin; *PBS= Phosphate Buffered Saline;* Tris= Tris(hydroxymethyl)aminomethane; *p.a.*: *pro analysi*; *SDS= Sodium dodecyl sulfate; w/o= without*

2.2.3 Antikörper und Kits

Antikörper	Hersteller
- **ADRB1 Polyklonaler Antikörper (bs-0498R)** - **ADRB1 Polyklonaler Antikörper, Alexa Fluor® 647 konjugiert (bs-0498R-A647)** - ***Rabbit* IgG Isotyp-Kontrolle, Alexa Fluor® 647-konjugiert (bs-0295P-A647)**	Bioss Antibodies Inc., Woburn, MA, USA
- **Norepinephrine Transporter Polyclonal Antibody (PA5-89680)**	Invitrogen, Waltham, MA, USA
- ***CD*19 *MicroBeads* human (130-050-301)**	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DEU

- **DAT *Rabbit* Polyklonaler Antikörper (22524-1-AP)** - **MAO-A Polyklonaler Antikörper (10539-1-AP)** - **MAO-B Polyklonaler Antikörper (12602-1-AP)** - **TH *Rabbit* Polyklonaler Antikörper (25859-1-AP)**	Proteintech Europe, Manchester, UK
- **GAPDH (14C10) *Rabbit mouse Antibody (*2118)**	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
- **Human alpha-1A *Adrenergic R*/ADRA1A Alexa Fluor®** - **488-konjugierter Antikörper (FAB10298G-100UG)** - **Human alpha-1B *Adrenergic R*/ADRA1B Alexa Fluor®** - **405-konjugierter Antikörper (IC4730V-100UG)** - **Human alpha-2A *Adrenergic R*/ADRA2A Alexa Fluor®** - **647-konjugierter Antikörper (FAB10129R-100UG)** - **Human alpha-2B *Adrenergic R*/ADRA2B Alexa Fluor®** - **647-konjugierter Antikörper (FAB10324R-100UG)** - **Human beta-2 *Adrenergic R*/ADRB2 Alexa Fluor®** - **488-konjugierter Antikörper (FAB100401G-100UG)** - **Human beta-3 *Adrenergic R*/ADRB3 Alexa Fluor®** - **488-konjugierter Antikörper (FAB9419G-100UG)** - **Maus IgG_1 Alexa Fluor® 488-konjugierter Antikörper (IC002G)** - **Maus IgG_1 Alexa Fluor® 647-konjugierter Antikörper (IC002R)** - **Maus IgG2B Alexa Fluor® 405-konjugierte Isotyp-Kontrolle (IC0041V)** - **Maus IgG2B Alexa Fluor® 647-konjugierte Isotyp-Kontrolle (IC0041R)**	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
- **Polyklonaler *Goat* Anti-*Rabbit* Immunoglobulin/ *HRP* (P0448)**	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA

Tabelle 5: Verwendete Antikörper mit Angaben zum Hersteller
ADR= Adrenerger Rezeptor; *CD= Cluster of differentiation;* GAPDH= Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; *HRP= Horseradish* Peroxidase; Ig= Immunglobulin; MAO= Monoaminooxidase; R= Rezeptor; TH= Tyrosinhydroxylase

Kit	Hersteller
- **Human IL-6 ELISA Set (555220)** - **Human IL-10 ELISA Set (555157)** - **Human TNF ELISA Set (555212)**	BD Biosciences, San-Diego, CA, USA
- ***Inside Stain* Kit (130-090-477)**	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DEU
- **Pierce™ *BCA Protein Assay* Kit (23227)**	Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL, USA

Tabelle 6: Verwendete Kits mit Angaben zum Hersteller
BCA= Bicinchoninic acid; ELISA= Enzyme-linked Immunosorbent Assay; IL= Interleukin*;* TNF= Tumor-Nekrose-Faktor

2.2.4 Software

Software	Hersteller
- **ChemDraw**	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
- **FlowJo™ vX.0.7**	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
- **i-control™**	Tecan Group Ltd., Männedorf, CHE
- **MACSQuantify™**	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DEU
- **Mendeley Reference Manager**	Mendeley Ltd., London, UK
- **Microplate Manager® 6** - **Image Lab™ Software**	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
- **MS Office Excel 2016** - **MS Office PowerPoint 2016** - **MS Office Word 2016**	Microsoft, Redmond, WA, USA
- **SPSS®**	IBM, Armonk, NY, USA

Tabelle 7: Verwendete Software mit Angaben zum Hersteller
MS= Microsoft

2.3 Zellkulturmedium und Zellzahlbestimmung

Für die Herstellung des Zellkulturmediums wurde RPMI-1640 verwendet, das mit 1 % *v/v* (*volume to volume*) Natriumpyruvat-Lösung (100 mmol/l), 1 % *v/v* 100-fach konzentrierter GlutaMax™-Lösung (200 mmol/l L-Alanyl-L-Glutamin-Dipeptid in 0,85%iger NaCl-Lösung), 1 % *v/v* 100-fach konzentrierter Penicillin-Streptomycin-Lösung (10.000 Einheiten/ml Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin), 2,5 % *v/v* HEPES-Puffer (1,0 mol/l) und 10% *v/v Fetal Bovine Serum* versetzt wurde. Das Medium wurde für maximal 30 Tage verwendet, bei 5 °C gelagert und vor Verwendung auf 36 °C erwärmt.

Die Zellzählung erfolgte am automatischen TC20™ Zellzähler von *Bio-Rad*. Dazu wurde 10 µl Zellsuspension 1:1 mit einer 0,4%igen Trypanblau-Lösung verdünnt und in den zum TC20™ Zellzähler passenden Zellzähl-Objektträger injiziert. Die Zellzahl wurde mikroskopisch mittels Autofokus bestimmt und in Zellen/ml angegeben. Anhand der Trypanblaufärbung toter Zellen wurde die Anzahl lebendiger Zellen in Zellzahl/ml und als prozentualer Anteil an der Gesamtzellzahl angegeben.

2.4 Probengewinnung

2.4.1 Isolation und Aufarbeitung peripherer mononukleärer Zellen

Die BZ-Isolation erfolgte aus frischen Blutproben (30-100 ml), welche mittels EDTA-Röhrchen (Ethylendinitrilotetraessigsäure) entnommen wurden. Nach der Blutabnahme erfolgte innerhalb von zwei Stunden die sterile Weiterverarbeitung der Blutproben. Vor der Verarbeitung wurden die Blutproben mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

Zunächst erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation die Isolation von *PBMC*s aus dem EDTA-Blut (181). Zu den *PBMC*s gehören Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten, die bei der Dichtegradientenzentrifugation vom Blutplasma, Erythrozyten und Granulozyten abgetrennt werden.

Für die Isolation der *PBMCs* wurden Leukosep™-Röhrchen mit einer porösen Trennscheibe von *Greiner-Bio One* verwendet. Diese wurden mit 15,0 ml Separationsmedium (LymphoPrep™, *Progen Biotechnik*) befüllt und zentrifugiert (30 Sekunden bei 1000xg, 18°C) (**Abb.3 A**). Die Röhrchen wurden anschließend mit 10-20 ml EDTA-Blut befüllt (**Abb.3 B**). Das Volumen wurde mit auf 36 °C erwärmtem *MACS® Separation Buffer (Separation Buffer= SB*) auf 45 ml aufgefüllt. Daraufhin wurden die Proben für 20 Minuten bei 800 x g und 18 °C ohne Abbremsen zentrifugiert. Nach der Zentrifugation ergab sich eine Schichtung, wie sie in

Abb.3 C dargestellt ist. Die *PBMCs* wurden durch ihre geringere Dichte von Erythrozyten und Granulozyten separiert und durch den Dichtegradienten entstand in jedem Röhrchen jeweils ein Leukozytenring.

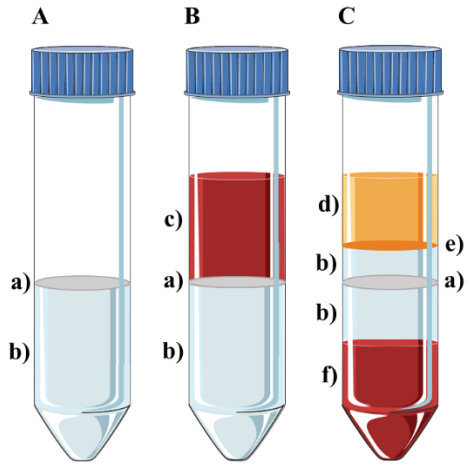


Abb.3: Schematische Darstellung der verwendeten Medien und Proben in den Leukosep™-Röhrchen und deren Schichtung nach der Dichtegradientenzentrifugation
A: Röhrchen mit **b)** 15,0 ml Separationsmedium befüllt, welches in den Raum unterhalb der **a)** porösen Trennscheibe zentrifugiert wurde. **B:** Befüllen des Röhrchens mit **c)** 10-20ml EDTA-Blut und auf 45 ml mit *Separation Buffer* auffüllen. **C:** Nach Zentrifugation ergibt sich durch den Dichtegradienten folgende Schichtung: **d)** Blutplasma, **e)** angereicherter Leukozytenring (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*), **b)** Separationsmedium, **a)** poröse Trennscheibe, **b)** Separationsmedium **f)** Zellpellet aus Granulozyten und Erythrozyten.
Abbildung erstellt unter Verwendung und Modifizierung von Bildern von Servier Medical Art von Servier, lizenziert unter Creative Commons Attribution 3.0 Unported (https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

Das Blutplasma wurde nach der Zentrifugation bis auf 5-10 mm oberhalb des Leukozytenrings abgesaugt und je ein oder zwei Leukozytenringe in ein Zentrifugationsröhrchen überführt. Dieses wurde mit *SB* auf ein Volumen von 45 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert (250 x g, 18 °C, zehn Minuten).

Die 10-fach konzentrierte *Red Blood Cell Lysis (RBCL)*-Lösung von *Miltenyi Biotec* wurde 1:10 mit Ampuwa® Spüllösung verdünnt. Nach der Zentrifugation der Zellen wurden die Überstände abgesaugt, das Zellpellet in 5,0 ml *RBCL*-Puffer resuspendiert und für zehn Minuten bei RT inkubiert. Die Erythrozyten-Lyse wurde durch Zugabe von 5,0 ml *SB* unterbrochen. Daraufhin erfolgte die Zellzählung der *PBMCs,* wie unter Kapitel **2.3** beschrieben.

2.4.2 Isolation und Aufarbeitung *CD*19+ BZ

*CD*19+ BZ wurden aus der *PBMC*-Suspension mittels magnetischer Zellseparation (182) durch positive Selektion isoliert. Dafür wurde auf 0 °C gekühlte *CD*19-*MicroBeads*-Lösung *(MicroBeads= MB*) von *Miltenyi Biotec* und *Separation Buffer* verwendet. Bei den *CD*19-*MB* handelt es sich um magnetische Mikrokügelchen, welche mit spezifischen AK für das humane *CD*19-Antigen beladen sind.

Die im folgenden angegebenen Volumina beziehen sich auf eine Zellzahl von 10^7 *PBMC*s und wurden entsprechend der ermittelten *PBMC*-Gesamtzellzahl linear skaliert. Die *PBMC*-Suspension (siehe Kapitel **2.4.1**) wurde für zehn Minuten zentrifugiert (300 x g, 18 °C), die Überstände abgesaugt und das Zellpellet in 80 µl/10^7 *PBMCs SB* resuspendiert. Daraufhin wurden 20 µl/10^7 *PBMCs* der *MB*-Lösung hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde für 15 Minuten bei 5 °C gelagert, währenddessen binden die *MB* an *CD*19-präsentierende Zellen (**Abb. 4 A)**. Danach wurde die Zellsuspension mit 20,0 ml *SB* verdünnt und erneut zentrifugiert (300 x g, 18 °C, zehn Minuten).

Zur magnetischen Zellseparation wurde der Magnetständer *MACS® Mulitstand* mit dem *QuadroMACS™-* oder *OctoMACS™-Separator* von *Miltenyi Biotec* je nach Zellzahl und Säulengröße verwendet (Kapazität der Säulen: MS-Säule: 10^7- 2 x 10^8 Zellen, LS-Säule: 10^8-2 x 10^{10} Zellen). Zur Filtration größere Partikel oder Zellverklumpungen wurde ein Filter mit einer Porengröße von 30 µm verwendet und auf die Säule gesteckt. Die Säule wurde mit *SB* vorgespült: die MS-Säule mit 500 µl, die LS-Säule mit 3,0 ml.

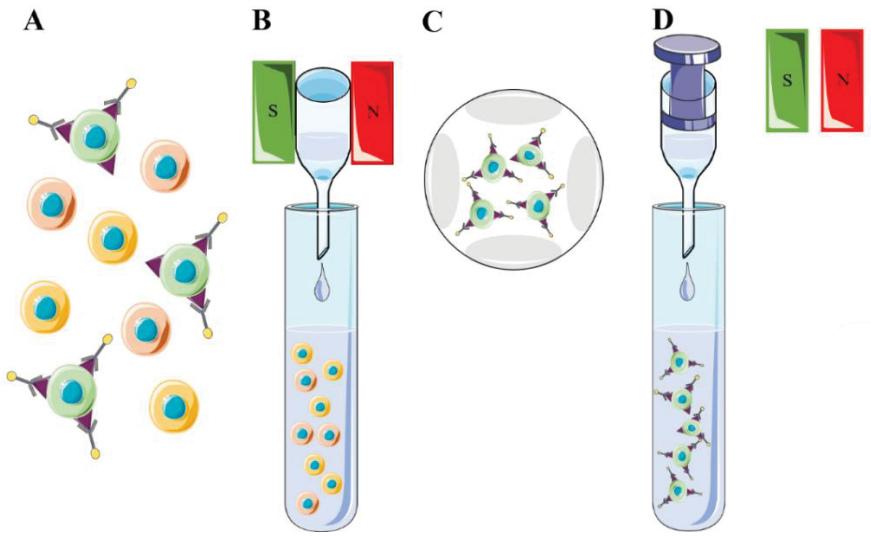


Abb. 4:Schematische Darstellung der magnetischen Zellseparation
A: Selektive Konjugation der mit *CD*19-spezifischen Antikörpern beladenen magnetischen *MicroBeads (*gelbe Kügelchen) an *CD*19 (lila Dreiecke) präsentierende Zellen. **B:** Elution der unerwünschten Zellfraktion bei Anliegen eines magnetischen Feldes. **C:** Querschnitt durch die Säule: An *CD*19-*MicroBeads* gebundene Zellen werden durch das Magnetfeld in der mit Stahlwolle ausgekleideten Säule retendiert. **D:** Elution der gewünschten *CD*19+ B-Zell-Fraktion unter Druck nach Entfernung des Magnetfeldes. *CD= Cluster of differentiation*
Abbildung erstellt unter Verwendung und Modifizierung von Bildern von Servier Medical Art von Servier, lizenziert unter Creative Commons Attribution 3.0 Unported (https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

Nach der Zentrifugation wurden die Überstände abgesaugt und das Zellpellet in *SB* resuspendiert: bei Verwendung der MS-Säule in 500 µl, bei der LS-Säule in 3,0 ml. Die Zellsuspension wurde daraufhin auf die MACS®-Säule aufgetragen und mit *SB* drei Mal nachgespült: die MS-Säule mit jeweils 500 µl, die LS-Säule mit jeweils 3,0 ml (**Abb. 4 B**). Die mit Stahlwolle ausgekleidete Säule hält die *CD*19+, *MB*-beladenen BZ durch den magnetischen

Gradienten innerhalb der Säule zurück (**Abb. 4 C**). Anschließend wurden die *CD*19+ BZ mit *SB* (MS-Säule: 1,0 ml, LS-Säule: 5,0 ml) unter Druck mit einem Kolben aus der Säule eluiert (**Abb. 4 D**). Die Zellsuspension wurde auf 10,0 ml mit *SB* aufgefüllt und die B-Zellzahl, wie im Kapitel **2.3** beschrieben, bestimmt.

2.4.3 Aktivierung *CD*19+ BZ mittels CpG ODN 2006

Für die Durchflusszytometrie und die Western Blot-Methode wurden naive Zellen mit Zellen, welche mit einem CpG-Typ-B-Motiv (ODN 2006: 5'-tcgtcgttttgtcgttttgtcgtt-3') stimuliert wurden, verglichen.

Zur Aktivierung der Zellen wurde die BZ-Zellsuspension nach der Isolation (siehe Kapitel **2.4.2**) für zehn Minuten bei 300 x g und 18 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde daraufhin in 3-5 ml Zellkulturmedium (siehe Kapitel **2.3**), welches mit CpG in einer Endkonzentration von 2,5 µg/ml versetzt wurde, resuspendiert. Die Zellen wurden daraufhin für 48 Stunden in einer Suspensionskulturflasche bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert.

Das vorbereitete CpG-Medium wurde für maximal 48 Stunden bei 5 °C gelagert. Nach der Inkubation erfolgte eine Zellzählung, wie im Kapitel **2.3** beschrieben.

2.5 Durchflusszytometrie

2.5.1 Färbung *CD*19+ B-Zell-Proben

Für die Durchflusszytometrie (183) wurden naive BZ unmittelbar nach der Isolation (siehe Kapitel **2.4.2**) und mittels CpG-ODNs stimulierte BZ (siehe Kapitel **2.4.3**) verwendet und die Ergebnisse beider Zellgruppen miteinander verglichen.

Folgende adrenerge Rezeptoren wurden durch fluoreszenzmarkierte AK adressiert: α1A-R, α1B-R, α2A-R, α2B-R, β1-R, β2-R und β3-R. Für den α2A-R, α2B-R und β1-R wurden Alexa-Fluor® 647 konjugierte AK verwendet; für den α1A-R, β2-R und β3-R mit Alexa-Fluor® 488 und für den α1B-R mit Alexa-Fluor® 405 markierte AK. Diese AK wurden zur Detektion der Rezeptoren auf der Plasmamembran (PM) und im intrazellulären Kompartiment (IK) eingesetzt. Für jede Kondition sollten je nach Verfügbarkeit BZ-Proben von drei bis fünf Probanden analysiert werden.

Die Zellsuspensionen der frisch isolierten und der CpG-aktivierten BZ wurden für zehn Minuten bei 300 x g und 18 °C zentrifugiert und die Überstände daraufhin abgesaugt. Für die Färbung mit jeweils einem fluoreszenzmarkierten AK wurden 100.000 bis 300.000 BZ benötigt. Die Färbungen wurden in 96-Well-Platten mit U-Boden durchgeführt.

Für die Färbung der adrenergen Rezeptoren auf der PM wurde das Zellpellet nach der Zentrifugation in 45 µl/Färbung *MACSQuant Running Buffer* (*RB*) resuspensiert und je 45 µl dieser Zellsuspension in ein Well gegeben. Pro Well wurden 5 µL einer AK-Lösung (0,2 mg/ml) hinzugegeben. Für den β1-ADR wurden 1 µl AK-Lösung (1 µg/µl) und 4 µl *RB* zu den 45 µl Zellsuspension hinzugegeben.

Um unspezifische Bindungen der Antikörper auszuschließen, wurden für jeden Probanden Isotyp-Kontrollen, Fluoreszenz-markierte AK mit demselben IgG-Subtyp wie der spezifische Antikörper, verwendet. Die eingesetzten Volumina für die Färbung mit den Isotypen-AK stimmten mit denen der spezifischen AK überein.

Die Zellen wurden für 30 Minuten auf dem Schüttler bei RT unter Lichtabschirmung inkubiert. Daraufhin wurden 150 µl/Well *RB* hinzugegeben und die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe Kapitel **2.5.2**).

Für die intrazelluläre Färbung der ADRs wurden die BZ zunächst in 300 µl BD Cytofix™ Fixations-Puffer (4,2 % *w/w* Formaldehyd) für 20 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden 300 µl *RB* hinzugegeben und die Zellen für zehn Minuten (300 x g, 18 °C) zentrifugiert. Die Überstände wurden abgesaugt und das Zellpellet in 45 µl/Färbung *Inside Perm* aus dem *Inside Stain* Kit von *Miltenyi Biotec* resuspendiert und je 45 µl dieser Zellsuspension in ein Well gegeben. Die verwendeten Volumina für die Färbung der intrazellulären Rezeptoren wurden analog zur Färbung der extrazellulären Rezeptoren eingesetzt. Nach 30 Minuten Inkubation auf dem Schüttler bei RT und unter Lichtabschirmung wurde in jedes Well 150 µl *RB* hinzugegeben und die 96-Well-Platte für zehn Minuten (300 x g, 18 °C) zentrifugiert. Die Überstände wurden abgesaugt und die Zellpellets in je 150 µl *Inside Perm* resuspendiert. Daraufhin wurde die Platte erneut zentrifugiert, die Überstände abgesaugt und die Zellpellets in je 200 µl *RB* resuspendiert. Anschließend konnten die Proben mittels Durchflusszytometrie analysiert werden (siehe Kapitel **2.5.2**).

2.5.2 Messung am Durchflusszytometer

Die BZ wurden direkt nach der Färbung (siehe Kapitel **2.5.1**) mit dem Durchflusszytometer MACSQuant® Analyzer 10 bei einer Flussrate von 2000 Zellen/Sekunde analysiert.

Das Grundprinzip der Durchflusszytometrie besteht darin, die nacheinander an einem Laserstrahl vorbeifließenden Zellen anhand der Lichtstreuung und Fluoreszenzemission zu analysieren. Währenddessen entsteht Vorwärtsstreulicht (*FSC= forward scatter*), das Informationen über die Größe und Seitwärtsstreulicht (*SSC= side scatter*), das Informationen über die Granularität einer Zelle liefert. Dadurch lassen sich einzelne Zelltypen voneinander

abgrenzen. Durch die Verwendung fluoreszenzmarkierter AK können Antigene auf der Zelloberfläche oder innerhalb der Zelle detektiert werden. Die gemessene Fluoreszenzintensität pro Zelle ist proportional zur Menge an gebundenem AK.

Alexa-Fluor® 647 konjugierte AK wurden bei einer Wellenlänge von 638 nm angeregt und bei einer Emission von 668 nm (beziehungsweise 665 nm bei den AK von *Bioss Antibodies*) detektiert. Alexa-Fluor® 488 markierte AK wurden bei 488 nm exzitiert und in einem Emissionsbereich von 515 nm bis 545 nm gemessen. Alexa-Fluor® 405 markierte AK wurden bei 405 nm exzitiert und die Emission bei 421 nm detektiert.

2.5.3 Auswertung und statistische Analyse

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der FlowJo™ vX.0.7 *Software* von *Becton, Dickinson and Company*. In **Abb. 5** ist das Vorgehen exemplarisch an einer BZ-Probe dargestellt: Die *FSC*-A (*forward scatter-area*) auf der Abszisse wurde gegen die *SSC-A* (*side scatter-area*) auf der Ordinate in einem *Dotplot* aufgetragen. Die *Area* ist das Integral aus der Pulshöhe (*FSC-H= forward scatter-height*) und Pulsbreite (*FSC-W= forward scatter-width*). In diesem *Dotplot* wurde die BZ-Population anhand der Zelldichte ausgewählt (**Abb. 5 A**).

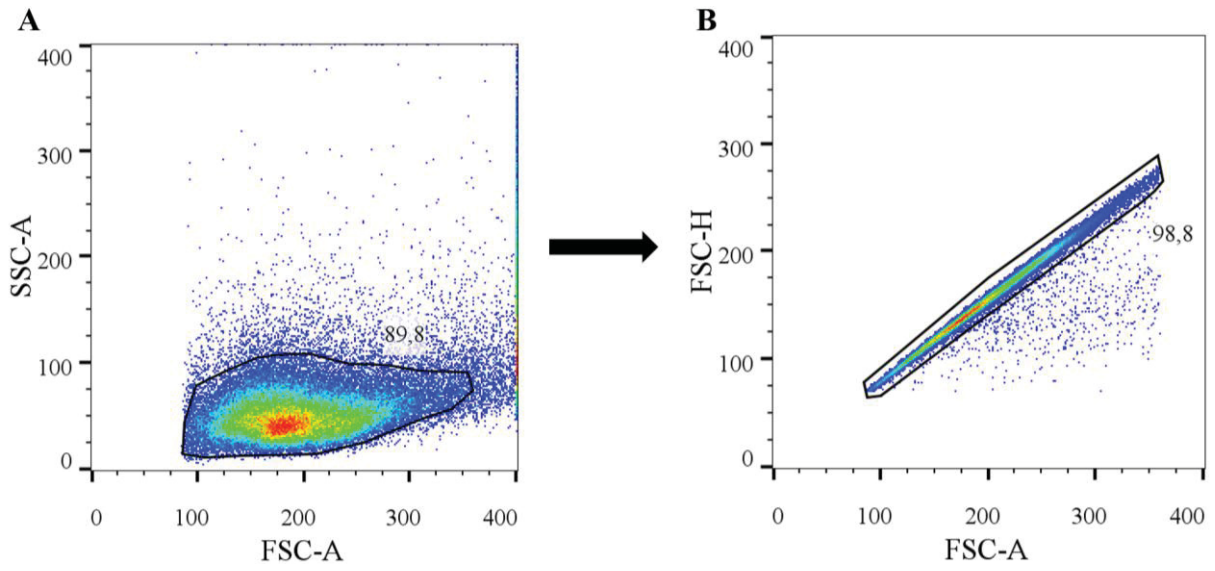


Abb. 5: Repräsentative Darstellung der B-Zell-Population (A) und der Einzelzell-Population (B)
A: Auswahl der B-Zell-Population anhand der Zelldichte. Die Angabe von 89,8 stellt den prozentualen Anteil der ausgewählten Zellen an allen gemessenen Ereignissen dar. **B:** Auswahl der Einzelzellen und Herausrechnen von Zell-Duplets anhand der Zelldichte. Die Angabe von 98,9 stellt den prozentualen Anteil der ausgewählten Zellen an allen in A ausgewählten B-Zellen dar.
FSC-A= forward scatter area; SSC-A= side scatter area

Um Zellen herauszurechnen, die aneinanderhaften oder den Laser zu kurz nacheinander passieren und somit nicht einzeln gemessen werden, wurde die *FSC-A* auf der Abszisse gegen die *FSC-H* auf der Ordinate aufgetragen und anhand dessen die Einzelzellen der Zelldichte nach

ausgewählt (**Abb. 5 B**). Durch die Messung von Zellduplets vergrößert sich nämlich die Puls-*Area* und Pulsbreite, die Pulshöhe bleibt gleich. Im *Dotplot* können so Zellen ausgeschlossen werden, die eine Zunahme der *FSC-A*, ohne Zunahme der *FSC-H* bedingen.

In **Abb. 6** wird repräsentativ die durchflusszytometrische Auswertung und der Anteil unspezifischer Bindungen an einer B-Zell-Probe an Histogrammen dargestellt.

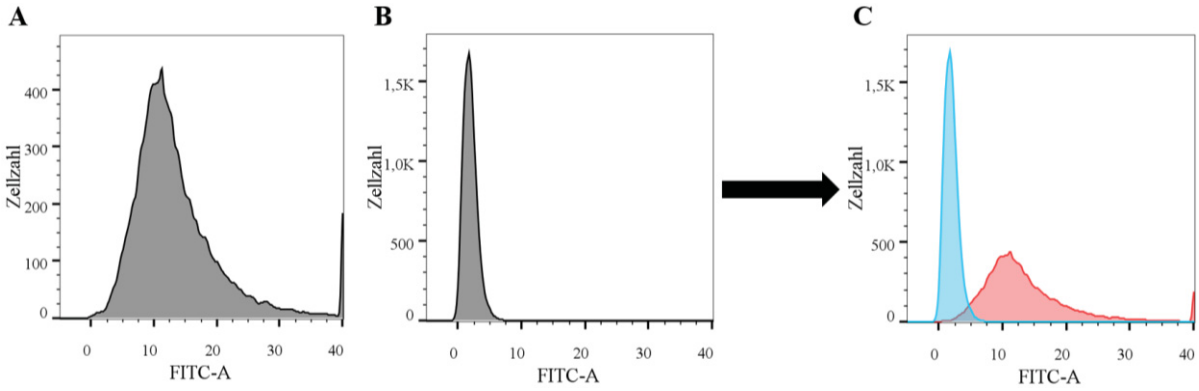


Abb. 6: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten im Histogramm
Repräsentative Darstellung der durchflusszytometrischen Auswertung anhand einer B-Zell-Probe. Die Fluoreszenzintensität des spezifischen Alexa Fluor® 488 (FITC) markierten Antikörpers gegen den adrenergen *β*3-Rezeptor (**A**, rotes Histogramm in **C**) und die Fluoreszenzintensität der Isotyp-Kontrolle (**B**, blaues Histogramm in **C**) auf der Abszisse wird gegen die Zellzahl auf der Ordinate aufgetragen. **C:** Zusammenfügung beider Histogramme, um den überschneidenden Bereich beider Antikörper darzustellen, welcher als unspezifische Bindungen herausgerechnet wird.
A=Area; FITC= Fluoresceinisothiocyanat

Nachdem die Zielpopulation in der Software ausgewählt wurde (**Abb. 5**), wurde der geometrische Mittelwert der Fluoreszenz-Intensität (MFI) aus jeder Messung für den spezifischen AK und für die Isotyp-Kontrolle ermittelt. Daraufhin wurde für jeden Probanden die MFI der Isotypen-Messungen von der MFI des spezifischem AK abgezogen.

Die statistische und grafische Analyse erfolgte mittels SPSS®-*Software* von *IBM*. Die Untersuchung der Expression adrenerger Rezeptoren auf der Plasmamembran und im intrazellulären Kompartiment humaner *CD*19+ BZ wurde mit der Expression naiver BZ verglichen. Für die Auswertung wurden die gebildeten Differenzen aus den geometrischen Mittelwerten der Fluoreszenz-Intensität des spezifischen Antikörpers und der Isotypen-Kontrolle verwendet. Als statistischer Test wurde der Mann-Whitney-U-Test (MWU-Test) mit einem Signifikanzniveau von 5 % angewendet.

Die abhängige Variable ist die MFI, die Stimulationsbedingung stellt die unabhängige Variable dar. Für den Signifikanztest wurde die exakte Signifikanz mit dem zweiseitigen p-Wert berechnet.

Zur Berechnung der Effektstärke wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient *r* ($r = \frac{z}{\sqrt{n}}$) (*z*= z-Statistik; n= Stichprobengröße) angewendet. Dieser wurde nach Cohen (184)

folgendermaßen interpretiert: $0{,}00 < |r| < 0{,}01$= vernachlässigbarer; $0{,}10 \leq |r| \leq 0{,}30$= schwacher; $0{,}30 \leq |r| \leq 0{,}50$= moderater; $|r| \geq 0{,}5$= starker Effekt.

2.6 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

2.6.1 Probenvorbereitung und Puffer

Die BZ wurden innerhalb von drei Stunden nach Isolation (siehe Kapitel **2.4.2**) mit verschiedenen ADR-Agonisten oder -Antagonisten inkubiert. Für jede Stimulationskondition wurden BZ-Proben von insgesamt acht bis zehn Probanden evaluiert und je nach Anzahl verfügbarer BZ aus der Blutprobe wurden die Stimulationskonditionen als Duplets oder Triplets angesetzt.

Die BZ-Suspension (siehe Kapitel **2.4.2**) wurde für zehn Minuten (300 x g, 18 °C) zentrifugiert und das Zellpellet daraufhin in 400 µL/10^6 BZ Zellkulturmedium (siehe Kapitel **2.3**) resuspensiert. Die Inkubation der Zellen erfolgte in 96-Well-Platten mit U-Boden. Pro Well wurden 100 µl dieser Zellsuspension (250.000 BZ) und 100 µl Zellkulturmedium, welches mit 5,0 µg/ml CpG-ODN 2006 und den jeweiligen Stimulanzien in ihrer zweifachen Zielkonzentration versetzt wurde, hinzugegeben. Die Vorverdünnungen der ADR-Agonisten und -Antagonisten erfolgten in *Phosphate Buffered Saline* (*PBS*).

In **Tabelle 8** sind die evaluierten Agonisten und Antagonisten mit ihrer Funktion an den adrenergen Rezeptoren in den eingesetzten Konzentrationen und die verwendeten Kombinationen mehrerer Stimulanzien dargestellt.

Stimulanz	Eingesetzte Konzentrationen (mol/l)	Funktion in den eingesetzten Konzentrationen
Isoproterenol (Iso)	10^{-5};10^{-6}; 10^{-7}; 10^{-8}; 10^{-9}	β1/2/3-R-Agonist
Nadolol (Nad)	10^{-6}; 10^{-7}	β1/2/3-R-Antagonist
Phenylephrine (Phen)	10^{-5};10^{-6}	α1-R-Agonist
Doxazosin (Doxa)	10^{-7}; 10^{-8}	α1-R-Antagonist
Dexmedetomidine (Dex)	10^{-6}; 10^{-7}	α2-R-Agonist
RS-79948 (RS)	10^{-7}; 10^{-8}	α2-R-Antagonist
BRL-37344 (BRL)	10^{-6}; 10^{-7}; 10^{-8}; 10^{-9}; 10^{-10}	β3-R-Agonist
CL-316,243 (CL)	10^{-6}; 10^{-7}; 10^{-8}; 10^{-9}; 10^{-10}	β3-R-Agonist
L-748,337 (L)	10^{-6}; 10^{-7}; 10^{-8}; 10^{-9}; 10^{-10}	β3-R-Antagonist
ICI-118,551 (ICI)	10^{-7}; 10^{-8}	β2-R-Antagonist
Norepinephrin	10^{-4};10^{-5};10^{-6}; 10^{-7}; 10^{-8}	α-R-Agonist; in höheren Konzentrationen auch β-R-Agonist
Iso + Doxa	$10^{-6} + 10^{-7}$	
Iso + RS	$10^{-6} + 10^{-7}$	
Iso + Doxa + RS	$10^{-6} + 10^{-7} + 10^{-7}$	
Iso + Phen	$10^{-6} + 10^{-5}$; $10^{-7} + 10^{-5}$; $10^{-8} + 10^{-5}$; $10^{-6} + 10^{-6}$;$10^{-7} + 10^{-6}$; $10^{-8} + 10^{-6}$;	
Iso + Nad	$10^{-6} + 10^{-6}$; $10^{-7} + 10^{-6}$; $10^{-8} + 10^{-6}$	

Phen + Doxa	$10^{-5} + 10^{-7}$; $10^{-6} + 10^{-7}$	
Iso + L	$10^{-6} + 5*10^{-8}$; $10^{-7} + 5*10^{-8}$; $10^{-8} + 5*10^{-8}$	
Iso + ICI	$10^{-6} + 10^{-8}$; $10^{-7} + 10^{-8}$; $10^{-8} + 10^{-8}$	
BRL + L	$10^{-6} + 5*10^{-8}$; $10^{-7} + 5*10^{-8}$; $10^{-8} + 5*10^{-8}$	
BRL + ICI	$10^{-6} + 10^{-8}$; $10^{-7} + 10^{-8}$; $10^{-8} + 10^{-8}$	
CL + L	$10^{-6} + 5*10^{-8}$; $10^{-7} + 5*10^{-8}$; $10^{-8} + 5*10^{-8}$	
CL + ICI	$10^{-6} + 10^{-8}$; $10^{-7} + 10^{-8}$; $10^{-8} + 10^{-8}$	

Tabelle 8: Evaluierte Stimulanzien
Tabellarische Auflistung der evaluierten Stimulanzien und deren agonistische oder antagonistische Funktion an adrenergen Rezeptoren in den jeweils eingesetzten Konzentrationen. Zudem ist dargestellt, welche Stimulanzien miteinander kombiniert wurden.
R=Rezeptor

Als Kontrollgruppe wurden nur mit CpG-ODN 2006 (2,5 µg/ml) stimulierte BZ verwendet. Die Proben wurden abgedeckt für 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Anschließend wurden die Proben für zehn Minuten (300 x g, 18 °C) zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und diese bis zur Verwendung im *ELISA* bei - 20 °C gelagert.

In der **Tabelle 9** sind die verwendeten Puffer für die *ELISA*-Methode dargestellt.

***Coating*-Puffer**	In *dd*H_2O: - 0,05 mol/l Carbonate-Bicarbonate Puffer (pH= 9,6)
***Assay*-Puffer**	In *PBS:* - 10 % *v/v FBS*
Waschpuffer	In *dd*H_2O: - 10 % *v/v PBS* - 0,05 %*v/v* Tween 20

Tabelle 9: Für die *ELISA*-Methode verwendete Puffer und deren Zusammensetzung
dd= doppelt destilliert; *FBS= Fetal Bovine Serum*; *PBS= Phosphate buffered saline; v/v= volume to volume*

2.6.2 Durchführung

Für die Durchführung der *ELISAs* wurden für die Zytokine IL-10-, IL-6- und TNF-*α Kits* von *BD Biosciences* nach dem Prinzip des „*Sandwich"*-Immunoassays und 96- oder 384- Well-Platten mit hohem Proteinbindungsvermögen verwendet.
Jedes Well wurde mit dem jeweiligem *Capture*-AK aus dem Set, welcher mit *Coating*-Puffer (siehe **Tabelle 9**) 1:250 verdünnt wurde, bei 4 °C über Nacht inkubiert (96-Well-Platte: 100 µl/Well; 384-Well-Platte: 15 µl/Well). Daraufhin wurde die Platte drei Mal mit Waschpuffer (siehe **Tabelle 9**) gewaschen und auf Zellstoff trocken geklopft. Um freie Bindungsstellen zu blockieren, wurden die gebundenen AK für eine Stunde bei RT unter Schütteln in *Assay*-Puffer (siehe **Tabelle 9**) inkubiert (96-Well-Platte: 200 µl/Well, 384-Well-Platte: 50 µl/Well) und anschließend drei Mal mit Waschpuffer gewaschen. Die

aufzutragenden Proben (siehe Kapitel **2.6.1**) wurden auf RT erwärmt und für den IL-6-*ELISA* je nach Bedarf 1:4 bis 1:8 mit *Assay*-Puffer verdünnt.

Die Interleukin- und TNF-Standardlösungen, welche bei - 80 °C gelagert wurden, wurden auf RT erwärmt und Verdünnungsreihen in *Assay*-Puffer gelöst vorbereitet. Die Standardreihe für IL-10- und TNF wurde in den Konzentrationen 500; 250; 125; 62,5; 31,3 und 15,6 pg/ml vorbereitet, für IL-6 wurden Verdünnungsreihen in den Konzentrationen 300; 150; 75; 37,5; 18,8 und 9,9 pg/ml angesetzt. Als Nullstandart wurde *Assay*-Puffer verwendet. Die Standardreihen wurden pro Platte jeweils in Triplets aufgetragen.

Nachdem die Proben und der Standard auf die Platten aufgetragen wurden (96-Well-Platte: 50 µl/Well; 384- Well-Platte: 15 µl/Well), wurden die Proben für zwei Stunden bei RT unter Schütteln inkubiert. Die Platte wurde anschließend fünf Mal mit Waschpuffer gewaschen.

Zur Detektion der Zytokine wurde der jeweilige biotinylierte Detektions-AK nach Herstellerangaben mit *Assay*-Puffer und dem Enzymreagenz (*HRP* (*Horseradish* Peroxidase)-konjugiertes Streptavidin) verdünnt und auf die Proben gegeben (96 -Well-Platte: 100 µl/Well, 384-Well-Platte: 15 µl/Well). Die Proben wurde für eine Stunde bei RT unter Schütteln inkubiert und anschließend sieben Mal mit Waschpuffer gewaschen, wobei dieser bei jedem Waschschritt eine Minute inkubiert wurde.

Pro Well wurden daraufhin 50 µl (96- Well-Platte) beziehungsweise 15 µl (384- Well-Platte) 1-Step™ Ultra TMB (Tetramethylbenzidin) von *Thermo Fischer Scientific* hinzugegeben und dieses für 30 Minuten bei RT unter Lichtabschirmung inkubiert. Um die Reaktion zu beenden, wurde dasselbe Volumen Stopp-Lösung (2 N H_2SO_4, 0,05 mol/l) hinzugegeben.

Die Absorption wurde anschließend photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzmessung bei 595 nm) an einem Plattenlesegerät (Infinite® M200 von *Tecan* (384-Well-Platte) oder iMark® von *Bio-Rad* (96-Well-Platte)) bestimmt.

2.6.3 Auswertung und statistische Analyse

Zur Berechnung der Interleukin- und TNF-Konzentration wurde zunächst die Differenz zwischen den gemessenen Absorptionen bei 450 nm und 595 nm bestimmt. Daraufhin wurde der arithmetische Mittelwert des Nullstandards von allen Absorptionswerten abgezogen. Aus den arithmetischen Mittelwerten der Standardreihen wurde eine 4-Parameter-Standartkurve (X=(A-D)/(1+(Y/C)B)+D) bestimmt, mit der Absorption auf der Ordinate und der Konzentration der Zytokine in pg/ml auf der Abszisse. Anhand der Standardkurve wurden die Zytokinkonzentrationen der einzelnen Proben berechnet.

Die statistische und grafische Analyse der Daten erfolgte mittels SPSS®-*Software* von *IBM*. Die durchgeführten *ELISA*s zeigen das Maß der Interleukin- und TNF-Produktion humaner BZ unter Stimulation mittels CpG 2006 und Modulation durch ADR-Agonisten und -Antagonisten. Als Vergleichsgruppe wurden BZ nur mit CpG 2006 stimuliert.

Um die Zytokinkonzentrationen zwischen den verschiedenen Stimulations-Konditionen und -Konzentrationen zu vergleichen, wurde der MWU-Test oder Kruskal-Wallis-Test (KW-Test) jeweils mit einem Signifikanzniveau von 5 % angewendet. Als *Post hoc*-Test für den KW-Test wurde der MWU-Test für den paarweisen Vergleich mit einem Signifikanzniveau von 5 % angewendet und der zweiseitige p-Wert mittels Bonferroni-Korrektur adjustiert.

Die abhängige Variable ist die gemessene IL-6-, IL-10- oder TNF-α-Konzentration angegeben als prozentualer Anteil relativ zum arithmetischen Mittelwert der Kontenration der Kontrollgruppe desselben Probanden, die Stimulationsbedingung in einer bestimmten Konzentration stellt die unabhängige Variable dar. Die Kontrollgruppe sind BZ, welche nur mit CpG stimuliert wurden.

Zur Berechnung der Effektstärke wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient r ($r= \frac{z}{\sqrt{n}}$) (z= z-Statistik; n= Stichprobengröße) angewendet. Dieser wird nach Cohen (184) folgendermaßen interpretiert: $0{,}00 < |r| < 0{,}01$= vernachlässigbarer; $0{,}10 \leq |r| \leq 0{,}30$= schwacher; $0{,}30 \leq |r| \leq 0{,}50$= moderater; $|r| \geq 0{,}5$= starker Effekt.

2.7 Western Blot

2.7.1 Probenvorbereitung und Puffer

Für die Western Blots (WB) wurden naive und mittels CpG 2006 stimulierte BZ verwendet. Dafür wurden die isolierten Zellsuspensionen (siehe Kapitel **2.4.2**) zunächst für zehn Minuten (300 x g, 18 °C) in 5-ml-*Tubes* zentrifugiert und die Überstände abgesaugt. Einige Zellpellets wurden daraufhin im naiven Zustand bis zur Weiterverwendung bei - 80 °C gelagert.

Zusätzlich wurden weitere Zellpellets derselben Probanden nach der Zentrifugation in 3,0 ml Zellkulturmedium (siehe Kapitel **2.3**), welches mit CpG 2006 (2,5 µg/ml) versetzt wurde, resuspensiert und für 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Daraufhin wurde die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel **2.3**) und die Zellsuspension für zehn Minuten zentrifugiert (300 x g, 18 °C), die Überstände wurden abgesaugt und dieses Zellpellet ebenfalls bis zur Verwendung bei - 80 °C gelagert.

In der **Tabelle 10** sind die für die Western-Blot-Methode verwendeten Puffer dargestellt.

RIPA-Puffer	In *dd*H_2O: - 50 mmol/l Tris, pH 8 - 150 mmol/l NaCl - 1% *v/v* Nonidet-P40 - 0,5 % *w/v* Na-Deoxycholat - 0,1 % *w/v SDS*
RIPA-*Complete*-Puffer	In 10,0 ml RIPA-Puffer: - Je 1 Tablette: o cOmplete™ Mini, Protease-Inhibitor-Cocktail o PhosSTOP™, Phosphatase-Inhibitor-Cocktail
Lämmli-Puffer	In *dd*H_2O: - 252 mmol/l Tris-HCl, pH 6,8 - 40 % *v/v* Glycerol - 8 % *w/v SDS* - 0,01 % *w/v* Bromphenolblau
Laufpuffer (Elphopuffer)	In *dd*H_2O: - 25 mmol/l Tris, pH 8,3-8,8 - 192 mmol/l Glycin - 0,1 % *w/v SDS*
Tris-Glycine Transferpuffer (25-fach konzentriert)	In *dd*H_2O: - 12 mmol/l Tris - 96 mmol/l Glycin
***Blotting*-Puffer**	In *dd*H_2O: - 8 % *v/v* Transferpuffer (25-fach konzentriert) - 10 % *v/v* Methanol
***TBS*-Puffer**	In *dd*H_2O: - 7,7 mmol/l Tris, pH 7,5 - 150 mmol/l NaCl
***TBS*-T-Puffer**	In *dd*H_2O: - 10 % *v/v* TBS-Puffer (10-fach konzentriert) - 0,1 % *v/v* Tween 20
***Blocking*- Puffer**	In *TBS*-T-Puffer: - 5 % *w/v* BSA oder 5 % *w/v Nonfat dry milk*-Pulver

Tabelle 10: Für die Western-Blot-Methode verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung
BSA= Bovines Serumalbumin; *dd*= doppelt destilliert; RIPA= Radioimmunpräzipitationsassay; *SDS= sodium dodecyl sulfate; TBS= Tris-buffered Saline;* Tris= Tris(hydroxymethyl)aminomethan; *v/v= volume to volume*; *w/v= weight to volume*

2.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für den WB wurde zunächst die Proteinkonzentration in den Zelllysaten mittels Pierce™ *BCA-Protein* (*Bicinchoninic acid)* Assay Kit von *Thermo Fischer Scientific* bestimmt. Die Zellproben (siehe Kapitel **2.7.1**) wurden auf 0 °C erwärmt und zu jedem Zellpellet 40 µl RIPA (Radioimmunpräzipitationsassay)-*Complete*-Puffer (siehe **Tabelle 10**) hinzugegeben. Die Proben wurden daraufhin in einem Zyklus von 0,5 Sekunden und einer Amplitude von 80 % 15 Impulse lang sonifiziert. 4 µl aus jeder Probe wurden 1:6 in *PBS* verdünnt und auf 0 °C gekühlt.

Eine BSA-Standard-Verdünnungsreihe (BSA=Bovines Serumalbumin) wurde in folgenden Konzentrationen durch Verdünnung in *PBS* hergestellt: 2; 1,5; 1,0; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125 und 0,025 µg/µl. Als Nullstandart wurde *PBS* verwendet.

In eine 96-Well-Platte wurden jeweils 10 µl jeder Standardverdünnung und der Proben in Duplets pipettiert. Auf jedes Well wurden 200 µl *Working*-Reagenz (Reagenz A: Reagenz B= 50:1) aus dem Pierce™ *BCA Protein Assay* Kit hinzugegeben. Die Proben wurden daraufhin für 30 Minuten bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Anschließend wurde die Absorption mit dem Plattenlesegerät Infinite® M200 PRO von *Tecan* bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen.

Zur Berechnung der Proteinkonzentration wurde zunächst der arithmetische Mittelwert des Nullstandards von allen Absorptionswerten abgezogen. Aus den arithmetischen Mittelwerten der Standardreihen wurde dann eine Standartkurve (Y=M*X+B) bestimmt, indem die Absorption auf der Ordinate gegen die Proteinkonzentration in µg/µl auf der Abszisse aufgetragen wurde. Anhand der Standardkurve wurden die Proteinkonzentrationen jeder Probe berechnet und aus den Duplets einer B-Zell-Probe der arithmetische Mittelwert gebildet.

Mithilfe der errechneten Proteinkonzentration konnten die zu entnehmenden Volumina für die Verdünnung der Zelllysate in *dd*H_2O (*dd*= doppelt destilliert) bestimmt werden. Für jede Probe wurden 20 µg Protein in 10 µl verdünnt. Zelllysat aus humanem Hirn-Tumor (71,4 µg/ml; 1:10 mit *dd*H_2O verdünnt) diente als Positivkontrolle. Alle Zelllysate wurden bei - 80 °C, die bereits mit *dd*H_2O verdünnten Proben und Positivkontrollen für maximal eine Woche bei - 20 °C bis zur Weiterverwendung gelagert.

2.7.3 Gelelektrophorese und Transfer

Bei der Elektrophorese bewegen sich die durch das *SDS* (*Sodium dodecyl sulfate*) negativ geladenen Moleküle in einem elektrischen Feld von der Kathode in Richtung Anode, was zur Trennung der Proteine nach ihrer Größe führt. Kleinere Proteine bewegen sich dabei schneller als größere und laufen daher im senkrecht stehenden Gel weiter nach unten.

Die bereits in *dd*H_2O verdünnten Proben (siehe Kapitel **2.7.2**) und der Proteinmarker wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Der Lämmli-Puffer (siehe **Tabelle 10**) wurde 4:1 mit *β*-Mercaptoethanol vermischt und jeweils 4 µl dieser Lösung zu den in 10 µl gelösten Proben hinzugegeben. Die Proben wurden daraufhin für zwei Minuten bei 13300 x g und 4 °C zentrifugiert, danach für fünf Minten bei 95 °C erwärmt und direkt darauf auf Eis gelagert.

Die verwendeten Stain-Free™ 4-15 %igen Gele wurden in die Gelkammern des Mini-PROTEAN® Tetra Cell der Firma *Bio-Rad* befestigt und diese mit Laufpuffer (siehe **Tabelle 10**) befüllt. Daraufhin wurden pro Ansatz jeweils 5 µl des ROTI®-Mark WESTERN PLUS Proteinmarkers und jeweils 12 µl der Proben (Positivkontrolle, naive und CpG-stimulierte BZ) in die Gelkammern hinzugegeben.

Die Gelkammern wurden daraufhin verschlossen und mittels PowerPac™ *Basic Power Supply* von *Bio-Rad* für die Gelelektrophorese an ein elektrisches Feld angelegt. Zunächst wurde 80 V angelegt, bis die Proteine vom Sammelgel eluiert wurden. Daraufhin wurde die Spannung zunächst auf 120 V, 150 V und zum Schluss auf 180 V erhöht.
Die Elektrophorese wurde nach Elution des Markers gestoppt, die Gele aus der Gelkammer entnommen, aus der Kassette gelöst und in Transferpuffer (siehe **Tabelle 10**) gelegt. Mit dem ChemiDoc™ MP *Imaging System* von *Bio-Rad* wurden unter ultraviolettem Licht Bilder der Gele aufgenommen, um die Proteinbanden zu visualisieren.

Daraufhin wurden die Gele für den Transfer der Proteinbanden auf eine Nitrocellulose-Membran vorbereitet. Das vorbereitete *Blotting*-Papier und die Nitrocellulose-Membran wurden mit *Blotting*-Puffer (siehe **Tabelle 10)** befeuchtet und anschließend wie in **Abb. 7** gestapelt in den Turboblotter Trans-Blot® Turbo™ von *Bio-Rad* gelegt. Daraufhin erfolgte der Transfer der Proteine vom Gel auf die Nitrocellulose-Membran innerhalb von zehn Minuten durch Anlegen eines elektrischen Felds bei 25 V und 2,5 A.

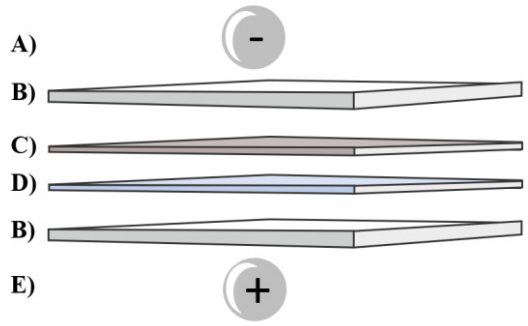


Abb. 7: Aufbau für den Proteintransfer vom Gel auf die Nitrocellulose-Membran im Turboblotter
A) Kathode (Deckel); **B)** *Blotting*-Papier; **C)** Gel; **D)** Nitrocellulose-Membran; **E)** Anode (Boden)
Abbildung erstellt unter Verwendung und Modifizierung von Bildern von Servier Medical Art von Servier, lizenziert unter Creative Commons Attribution 3.0 Unported (https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

2.7.4 Immunmarkierung

Mittels Immunmarkierung und der WB-Methode sollte der Norepinephrin-Transporter, der Dopamin-Transporter, die MAO-A und MAO-B, die Tyrosinhydroxylase und der adrenerge β1-R detektiert werden. Dafür wurden die *Blots* nach dem Transfer (siehe Kapitel **2.7.3**) in *PBS* eingelegt für maximal zwei Wochen bei 5 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert oder direkt weiterverwendet.

Antikörper	Verdünnung	Eingesetzte Konzentration (µg/ml)
Norepinephrin-Transporter	1:500	4
Dopamin-Transporter	1:500	1,2
MAO-A	1:500	1,2
MAO-B	1:1000	0,4
Tyrosinhydroxylase	1:2000	0,4
ADR-β1	1:500	2

Tabelle 11: Eingesetzte AK-Konzentrationen für die Immunmarkierung durch Verdünnung in *Blocking*-Lösung mit 5 % *w/v Nonfat dry milk* Pulver
ADR= adrenerger Rezeptor MAO= Monoaminooxidase

Dafür wurden die *Blots* in Zentrifugenröhrchen positioniert und 10,0 ml *Blocking*-Puffer (siehe **Tabelle 10**) hinzugegeben. Für jede AK-Färbung wurden beide *Blocking*-Ansätze sowohl mit 5 % *w/v* (*weight to volume*) BSA als auch mit 5 % *w/v Nonfat-dry-milk*-Pulver, an verschiedenen *Blots* ausprobiert. Die *Blocking*-Lösung wurde für 1- 1,5 Stunden bei RT auf einem Tubenroller inkubiert. Anschließend wurde der *Blocking*-Puffer dekantiert und die *Blots* in den Röhrchen mit 3,0 ml AK-Lösung versetzt. Dafür wurden die verwendeten AK in *Blocking*-Lösung mit 5 % *w/v Nonfat-dry-milk*-Pulver verdünnt. Die eingesetzten Verdünnungen der AK sind der **Tabelle 11** zu entnehmen. Diese AK-Lösungen wurden bei 4 °C über Nacht auf einem Tubenroller inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die AK-Lösung dekantiert und bei - 20 °C bis zur Wiederverwendung (maximal drei Mal) gelagert. Die *Blots* in den Röhrchen wurden mit jeweils 10,0 ml *TBS (Tris-buffered Saline)*-T-Puffer (siehe **Tabelle 10**) drei Mal für je fünf Minuten auf dem Tubenroller bei RT gewaschen.
Daraufhin erfolgte die Herstellung der Zweitantikörper-Lösung durch 1:1000 Verdünnung eines polyklonalen *Goat* Anti-*Rabbit* Immunoglobulins (*Agilent Technologies)*, gekoppelt mit *HRP*, in *TBS*-T-Puffer. Je 4,0 ml dieser Zweitantikörper-Lösung wurden zu den Blots gegeben und für eine Stunde bei RT unter Lichtabschirmung auf dem Tubenroller inkubiert. Nach der Inkubation wurden die *Blots* erneut mit jeweils 10,0 ml *TBS*-T-Puffer drei Mal für je fünf Minuten auf dem Taubenroller bei RT gewaschen.
Daraufhin erfolgte die Detektion der Proteinbanden mit dem ChemiDoc™ MP *Imaging System.* Zum Entwickeln wurden jeweils 1,5 ml vom Immobilon® Forte Western *HRP*-Substrat von *Merck Millipore* verwendet, mit welchem der Blot durch mehrmaliges Pipettieren angefeuchtet wurde. Daraufhin wurden mittels Chemilumineszenz jeweils 10 Bilder bei einer Belichtungszeit von 250 Sekunden aufgenommen.
Entweder am selben Tag oder nach Zwischenlagerung der Blots in *TBS*-Puffer (siehe **Tabelle 10**) wurde die Inkubation mit GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) durchgeführt, um zu überprüfen, ob bei allen Proben die gleiche Proteinmenge aufgetragen

wurde. Der GAPDH-AK wurde 1:3000 in 5 % *w/v* BSA-Blocking-Puffer (siehe **Tabelle 10**) verdünnt. 3,0 ml dieser AK-Lösung wurden zu einem im Zentrifugationsröhrchen positioniertem Blot hinzugegeben und für eine Stunde bei RT auf dem Tubenroller inkubiert. Die Färbung mit dem Zweitantikörper erfolgte analog zur Beschreibung oben im Text. Nach drei Waschschritten konnten die Proteinbanden entwickelt werden. Dabei wurden bei einer maximalen Belichtungszeit von 160 Sekunden 10 Bilder aufgenommen.

2.7.5 Auswertung

Die Auswertung der Western Blots erfolgte mittels der Image Lab™ Software von *Bio-Rad*. Die mit dem ChemiDoc™ MP *Imaging System* aufgenommenen Bilder wurden anschließend digital nachbearbeitet, um die spezifischen Banden hervorzuheben. Es erfolgte eine rein qualitative Analyse.

3 Ergebnisse

3.1 Expression adrenerger Rezeptoren *CD*19+ naiver und CpG-stimulierter humaner B-Zellen

Um die Wirkung von Katecholaminen und synthetischen Liganden auf *CD*19+ humanen BZ abschätzen zu können, war zunächst die Untersuchung und Auswertung der Expression der adrenergen Rezeptoren auf diesen Zellen von Interesse. Die adrenergen Rezeptoren auf den Immunzellen stellen die Schnittstelle für die neuroimmunologische Modulation dar. Folgende adrenerge Rezeptoren wurden durch fluoreszenzmarkierte AK adressiert: α1A-R, α1B-R, α2A-R, α2B-R, β1-R, β2-R und β3-R. Es erfolgte die Analyse der Expression auf der Plasmamembran und im intrazellulären Kompartiment sowohl von naiven als auch CpG-aktivierten BZ. Die Ergebnisse aller durchgeführten Mann-Whitney-U-Tests zur Untersuchung und Vergleich der Expression der adrenergen Rezeptoren auf der Plasmamembran und im intrazellulären Kompartiment sind **Tabelle 12** zu entnehmen.

Rezeptor	Gruppe 1	Gruppe 2	U-Wert	z-Score	p-Wert	*r*	95% KI (*r*)
***α*1A-ADR**	PM, naiver BZ	PM, stimulierter BZ	6,00	-2,36	0,018	-0,63	-0,87; -0,15
	IK, naiver BZ	IK, stimulierter BZ	7,00	-1,07	0,352		
***α2*A-ADR**	PM, naiver BZ	PM, stimulierter BZ	11,50	-0,65	0,569		
	IK, naiver BZ	IK, stimulierter BZ	12,00	-1,00	0,351		
***α2B*-ADR**	PM, naiver BZ	PM, stimulierter BZ	6,00	-2,33	0,018	-0,62	-0,87; -0,15
	IK, naiver BZ	IK, stimulierter BZ	15,00	-1,00	>0,999		
***β*1-ADR**	PM, naiver BZ	PM, stimulierter BZ	3,00	-2,00	0,048	-0,63	-0,90; -0,004
	IK, naiver BZ	IK, stimulierter BZ	18,00	0,00	>0,999		
***β*2-ADR**	PM, naiver BZ	PM, stimulierter BZ	10,00	-1,89	0,073		
	IK, naiver BZ	IK, stimulierter BZ	9,00	-1,44	0,180		
***β*3-ADR**	PM, naiver BZ	PM, stimulierter BZ	2,00	-2,13	0,038	-0,67	-0,92; -0,08
	IK, naiver BZ	IK, stimulierter BZ	9,00	1,10	0,329		

Tabelle 12: Ergebnisse der durchgeführten Mann-Whitney-U-Tests zur Untersuchung der Expression der ADR im IK und auf der PM
ADR= Adrenerger Rezeptor; IK= Intrazelluläres Kompartiment; KI= Konfidenzintervall; PM= Plasmamembran; *r*= Pearson-Korrelationskoeffizient

3.1.1 Expression des adrenergen α1A-Rezeptors

Der α1A-ADR wurde auf der PM und im IK der analysierten BZ exprimiert. Bei der Untersuchung des α1A-ADR auf der PM ergab sich auf stimulierten BZ ein signifikanter Anstieg der MFI im Vergleich zu naiven BZ (p= 0,018; **Abb. 8 A**). Bei der intrazellulären Menge von α1A-ADR gab es keine Unterschiede zwischen naiven und CpG-stimulierten BZ (**Abb. 8 B**). Die deskriptiven Statistiken zu den untersuchten Gruppen sind **Tabelle 13** zu entnehmen.

	M_{Rang}	Mdn.	IQA
PM, naiver BZ	4,86	2,12	0,80
PM, CpG stimulierter BZ	10,14	3,13	2,51
IK, naiver BZ	4,67	0,91	0,63
IK, CpG stimulierter BZ	6,75	1,17	1,23

Tabelle 13: Deskriptive Statistik der MFI des adrenergen α1A-Rezeptors
BZ= B-Zellen; IK= Intrazelluläres Kompartiment; IQA= Interquartilsabstand; Mdn.= Median; MFI= Mittlere Fluoreszenzintensität; M_{Rang}= Mittlerer Rang; PM= Plasmamembran

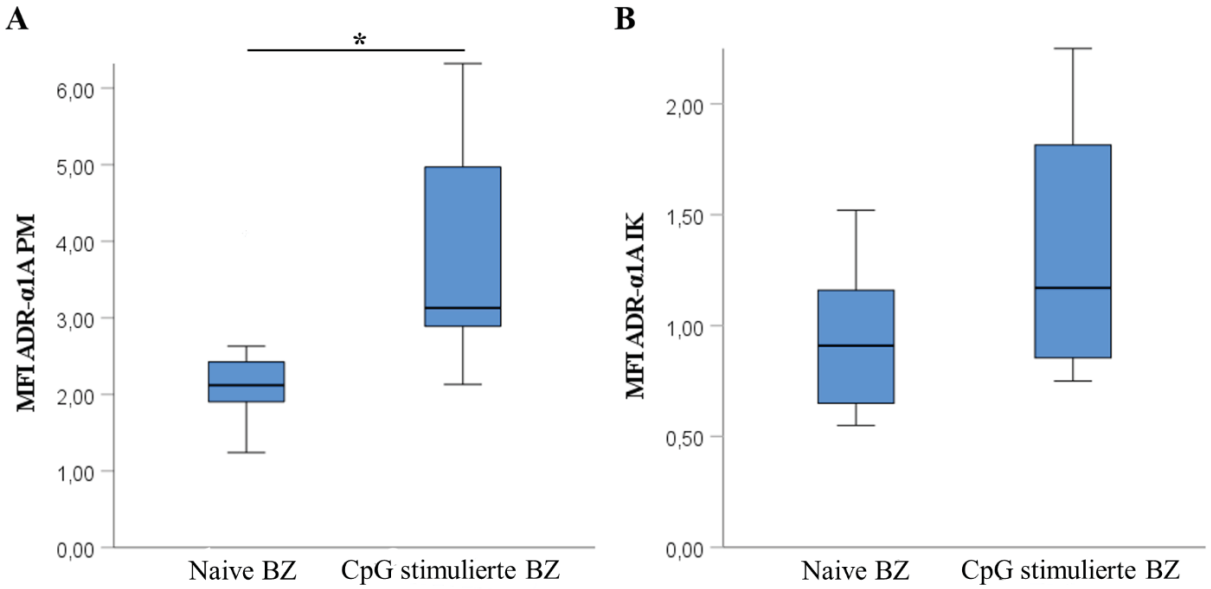


Abb. 8: Expression des α1A-ADR auf der PM (A) und im IK (B) von *CD*19+, humanen BZ
B-Zellen wurden sowohl naiv als auch nach 48 h Inkubation mit CpG (2.5 µg/ml) analysiert. Die dargestellten MFI ergeben sich aus der Differenz der geometrischen Mittelwerte des spezifischen Antikörpers und der Isotypen-Kontrolle. Zum Vergleich der naiven mit CpG-stimulierten BZ wurde der Mann-Whitney-U-Tests verwendet. Das Signifikanzniveau lag bei * p≤ 0,05.
PM naiver BZ: n= 7; PM CpG stimulierter BZ: n= 7; IK naiver BZ: n= 6; IK CpG stimulierter BZ: n= 4
ADR= Adrenerger Rezeptor; BZ= B-Zellen; IK= Intrazelluläres Kompartiment; MFI= Mittlere Fluoreszenzintensität; PM= Plasmamembran

3.1.2 Expression des adrenergen α1B-Rezeptors

Des Weiteren wurde die Expression des α1B-ADR untersucht. Die durchflusszytometrischen Ergebnisse zeigten bei naiven und stimulierten BZ, auf der PM und im IK nach Subtraktion unspezifischer Bindungen keine Fluoreszenzsignale. Mittelwerte (M) mit Angabe des Standardfehlers (*SD*) der MFI des AK für den α1B-ADR auf der PM naiver BZ: M= 0,11; *SD*= 0,03 (n= 2); auf der PM stimulierter BZ: M= - 0,32; *SD*= 0,16 (n= 3); im IK stimulierter BZ: M= - 0,83; *SD*= 0,46 (n= 3); n= 0 für die Untersuchung der Expression im IK naiver BZ.

3.1.3 Expression des adrenergen α2A-Rezeptors

Für die Untersuchung der Ausprägung des α2A-ADR ergaben sich in allen untersuchten Konditionen Fluoreszenz-Intensitäten mit Werten nahe Null. Dies deutet darauf hindeutet, dass der Rezeptor auf den analysierten BZ nicht exprimiert wurde (**Abb. 9**). Die deskriptiven Statistiken der untersuchten Gruppen sind **Tabelle 14** zu entnehmen.

	M_{Rang}	Mdn.	IQA
PM, naiver BZ	5,42	0,075	0,05
PM, CpG stimulierter BZ	6,70	0,07	0,07
IK, naiver BZ	5,50	0,005	0,02
IK, CpG stimulierter BZ	7,50	0,01	0,05

Tabelle 14: Deskriptive Statistik der MFI des adrenergen α2A-Rezeptors
BZ= B-Zellen; IK= Intrazelluläres Kompartiment; IQA= Interquartilsabstand; Mdn.= Median; MFI= Mittlere Fluoreszenzintensität; M_{Rang}= Mittlerer Rang; PM= Plasmamembran

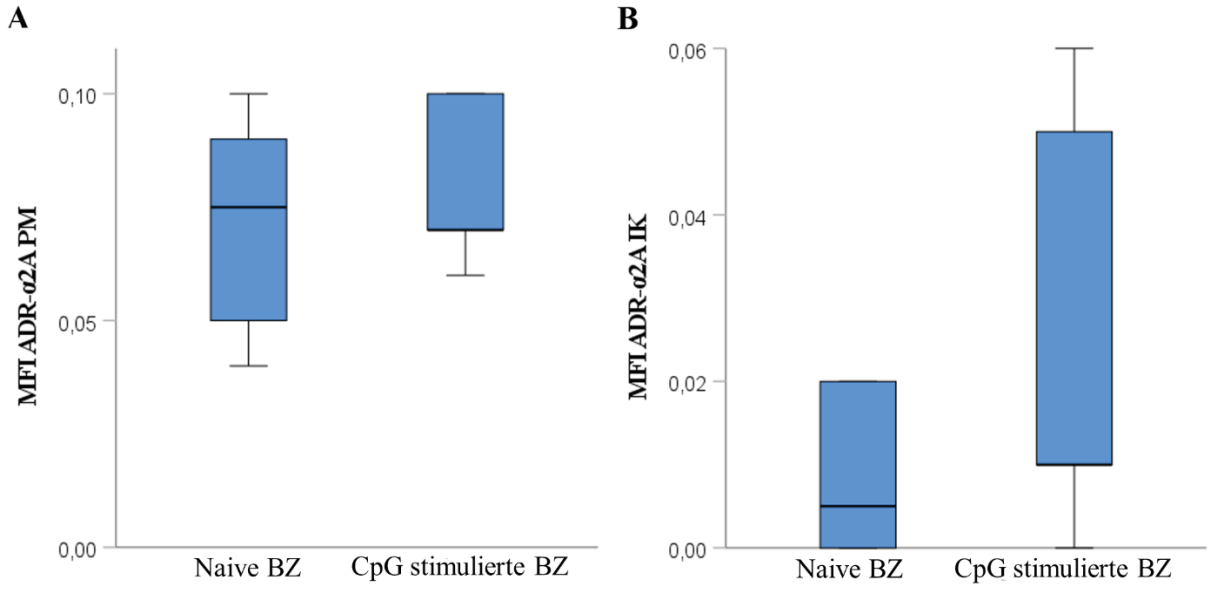


Abb. 9: Expression des α2A-ADR auf der PM (A) und im IK (B) von *CD*19+, humanen BZ
B-Zellen wurden sowohl naiv als auch nach 48 h Inkubation mit CpG (2.5 µg/ml) analysiert. Die dargestellten MFI ergeben sich aus der Differenz der geometrischen Mittelwerte des spezifischen Antikörpers und der Isotypen-Kontrolle. Zum Vergleich der naiven mit CpG-stimulierten BZ wurde der Mann-Whitney-U-Tests verwendet. Das Signifikanzniveau lag bei * p≤ 0,05.
PM naiver BZ: n= 6; PM CpG stimulierter BZ: n= 5; IK naiver BZ: n= 6; IK CpG stimulierter BZ: n= 6
ADR= Adrenerger Rezeptor; BZ= B-Zellen; IK= Intrazelluläres Kompartiment; MFI= Mittlere Fluoreszenzintensität; PM= Plasmamembran

3.1.4 Expression des adrenergen α2B-Rezeptors

Der α2B-ADR wurde auf der PM der BZ nachgewiesen. Die MFI für die Expression des α2B-ADR war auf der PM stimulierter, im Vergleich zu naiven BZ, erhöht (p= 0,018; **Abb. 10)**. Die Untersuchungen im IK hingegen zeigten, dass der Rezeptor in naiven (n= 6) und stimulierten BZ (n= 6) nicht exprimiert wurde und auch eine CpG-Stimulation keinen signifikanten Unterschied in der Ausprägung ergab. Die deskriptiven Statistiken zu den untersuchten Gruppen finden sich **Tabelle 15**.

	M_{Rang}	Mdn.	IQA
PM, naiver BZ	5,25	0,19	0,09
PM, CpG stimulierter BZ	10,50	0,345	0,21
IK, naiver BZ	6,00	0,00	0,00
IK, CpG stimulierter BZ	7,00	0,00	0,003

Tabelle 15: Deskriptive Statistik der MFI des adrenergen α2B-Rezeptors
BZ= B-Zellen; IK= Intrazelluläres Kompartiment; IQA= Interquartilsabstand; Mdn.= Median; MFI= Mittlere Fluoreszenzintensität; M_{Rang}= Mittlerer Rang; PM= Plasmamembran

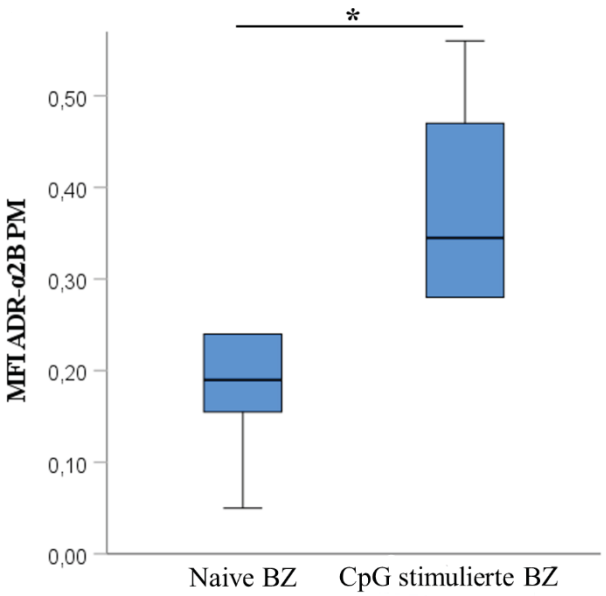


Abb. 10 Expression des *α*2B-ADR auf der PM *CD*19+, humaner BZ
B-Zellen wurden sowohl naiv als auch nach 48 h Inkubation mit CpG (2.5 µg/ml) analysiert. Die dargestellten MFI ergeben sich aus der Differenz der geometrischen Mittelwerte des spezifischen Antikörpers und der Isotypen-Kontrolle. Zum Vergleich der naiven mit CpG-stimulierten BZ wurde der Mann-Whitney-U-Tests verwendet. Das Signifikanzniveau lag bei * p≤ 0,05.
PM naiver BZ: n= 8; PM CpG stimulierter BZ: n= 6
ADR= Adrenerger Rezeptor; BZ= B-Zellen; MFI= Mittlere Fluoreszenzintensität; PM= Plasmamembran

3.1.5 Expression des adrenergen *β*1-Rezeptors

Untersuchung der Ausprägung des *β*1-ADR auf der PM zeigten auf naiven (n= 5) und CpG-stimulierten (n= 5) BZ, dass dieser nicht exprimiert wurde. Im IK ließ sich eine Expression des *β*1-ADR nachweisen. Ein Vergleich der MFI zwischen naiven und stimulierten BZ stellte jedoch keinen signifikanten Unterschied dar (**Abb. 11**). Die deskriptiven Statistiken zu den untersuchten Gruppen sind in **Tabelle 16** dargestellt.

	M_{Rang}	Mdn.	IQA
PM, naiver BZ	3,60	-0,56	0,42
PM, CpG stimulierter BZ	7,40	-0,22	0,48
IK, naiver BZ	6,50	1,17	0,72
IK, CpG stimulierter BZ	6,50	1,255	0,86

Tabelle 16: Deskriptive Statistik der MFI des adrenergen *β*1-Rezeptors
BZ= B-Zellen; IK= intrazelluläres Kompartiment; IQA= Interquartilsabstand; Mdn.= Median; MFI= Mittlere Fluoreszenzintensität; M_{Rang}= Mittlerer Rang; PM= Plasmamembran

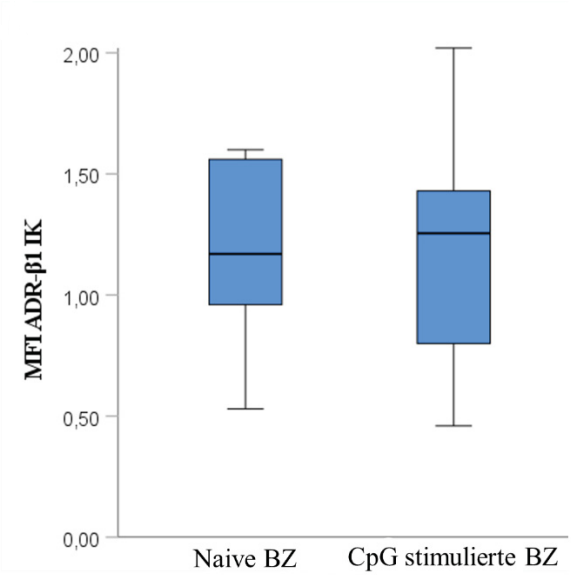


Abb. 11: Expression des *β*1-ADR im IK *CD*19+, humaner BZ
B-Zellen wurden sowohl naiv als auch nach 48 h Inkubation mit CpG (2.5 µg/ml) analysiert. Die dargestellten MFI ergeben sich aus der Differenz der geometrischen Mittelwerte des spezifischen Antikörpers und der Isotypen-Kontrolle. Zum Vergleich der naiven mit CpG-stimulierten BZ wurde der Mann-Whitney-U-Tests verwendet. Das Signifikanzniveau lag bei *p≤ 0,05.
IK naiver BZ: n= 6; IK CpG stimulierter BZ: n= 6
ADR= Adrenerger Rezeptor; BZ= B-Zellen; IK= Intrazelluläres Kompartiment; MFI= Mittlere Fluoreszenzintensität; PM= Plasmamembran

3.1.6 Expression des adrenergen *β*2-Rezeptors

Der *β*2-ADR ließ sich auf der PM und im IK nachweisen. Vergleiche der MFI zwischen naiven und stimulierten BZ auf der PM (**Abb. 12 A**) und im IK (**Abb. 12 B**) zeigten keinen CpG-bedingten Einfluss auf die Expression. Die deskriptiven Statistiken der untersuchten Gruppen sind **Tabelle 17** zu entnehmen.

	M_{Rang}	Mdn.	IQA
PM, naiver BZ	5,43	1,77	0,57
PM, CpG stimulierter BZ	9,57	2,79	1,05
IK, naiver BZ	5,00	0,665	0,43
IK, CpG stimulierter BZ	8,00	0,895	0,72

Tabelle 17: Deskriptive Statistik der MFI des adrenergen *β*2-Rezeptors
BZ= B-Zellen; IK= intrazelluläres Kompartiment; IQA= Interquartilsabstand; Mdn.= Median; MFI= Mittlere Fluoreszenzintensität; M_{Rang}= Mittlerer Rang; PM= Plasmamembran

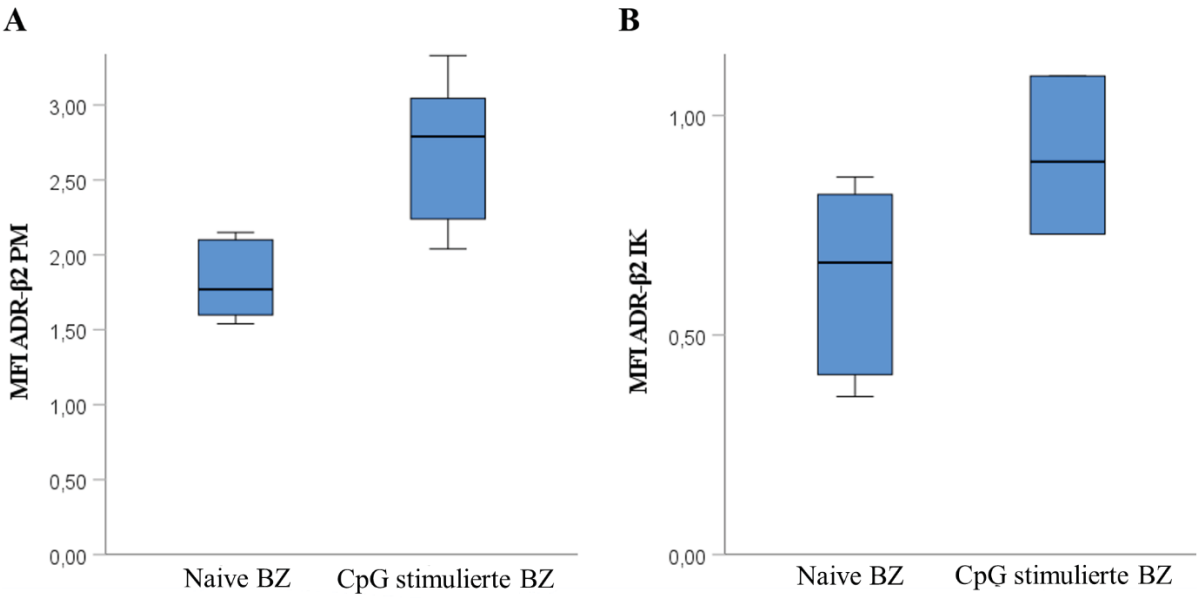


Abb. 12: Expression des *β*2-ADR auf der PM (A) und im IK (B) von *CD*19+, humanen BZ
B-Zellen wurden sowohl naiv als auch nach 48 h Inkubation mit CpG (2.5 µg/ml) analysiert. Die dargestellten MFI ergeben sich aus der Differenz der geometrischen Mittelwerte des spezifischen Antikörpers und der Isotypen-Kontrolle. Zum Vergleich der naiven mit CpG-stimulierten BZ wurde der Mann-Whitney-U-Tests verwendet. Das Signifikanzniveau lag bei * p≤ 0,05.
PM naiver BZ: n= 7; PM CpG stimulierter BZ: n= 7; IK naiver BZ: n= 6; IK CpG stimulierter BZ: n= 6
ADR= Adrenerger Rezeptor; BZ= B-Zellen; IK= Intrazelluläres Kompartiment; MFI= Mittlere Fluoreszenzintensität; PM= Plasmamembran

3.1.7 Expression des adrenergen *β*3-Rezeptors

Mittels Durchflusszytometrie konnte der *β*3-ADR auf der PM und im IK nachgewiesen werden. Die MFI für die Expression des Rezeptors auf der PM war auf stimulierten im Vergleich zu naiven BZ erhöht (p= 0,038; **Abb. 13 A**). Ein Vergleich der Stimulationsbedingungen im IK zeigte keinen signifikanten Unterschied (**Abb. 13 B**). Die deskriptiven Statistiken zu den untersuchten Gruppen sind in **Tabelle 18** dargestellt.

	M_{Rang}	Mdn.	IQA
PM, naiver BZ	3,00	1,47	1,04
PM, CpG stimulierter BZ	7,17	2,715	0,84
IK, naiver BZ	7,20	8,79	11,82
IK, CpG stimulierter BZ	5,00	7,35	4,99

Tabelle 18: Deskriptive Statistik der MFI des adrenergen *β*3-Rezeptors
BZ= B-Zellen; IK= intrazelluläres Kompartiment; IQA= Interquartilsabstand; Mdn.= Median; MFI= Mittlere Fluoreszenzintensität; M_{Rang}= Mittlerer Rang; PM= Plasmamembran

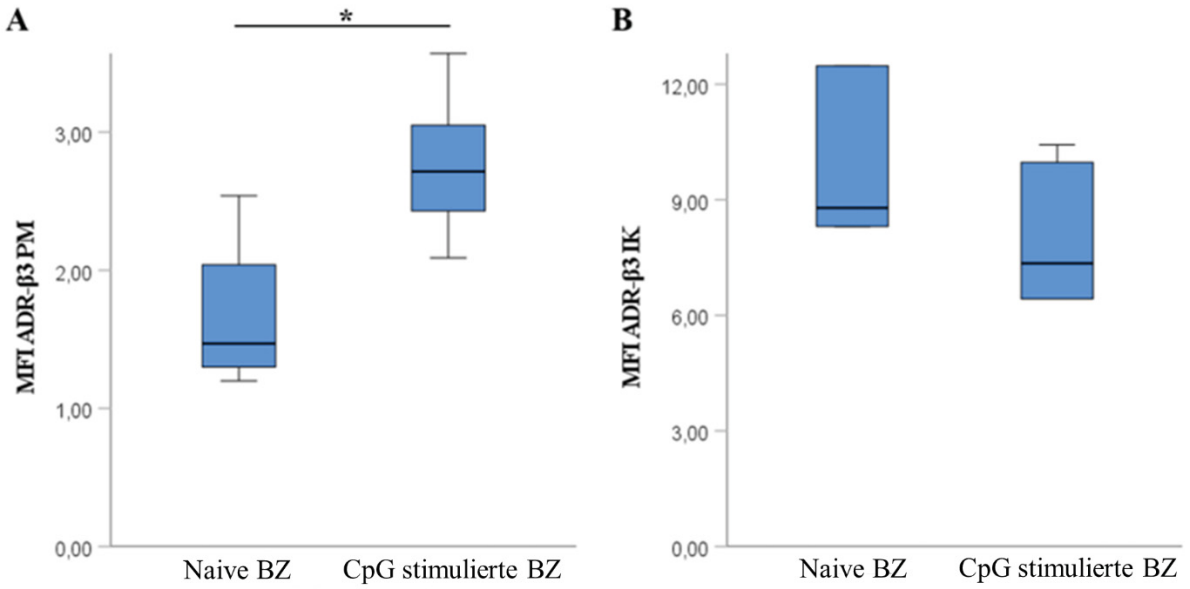


Abb. 13: Expression des *β*3-ADR auf der PM (A) und im IK (B) von *CD*19+, humanen BZ
B-Zellen wurden sowohl naiv als auch nach 48 h Inkubation mit CpG (2.5 µg/ml) analysiert. Die dargestellten MFI ergeben sich aus der Differenz der geometrischen Mittelwerte des spezifischen Antikörpers und der Isotypen-Kontrolle. Zum Vergleich der naiven mit CpG-stimulierten BZ wurde der Mann-Whitney-U-Tests verwendet. Das Signifikanzniveau lag bei * p≤ 0,05.
PM naiver BZ: n= 4; PM CpG stimulierter BZ: n= 6; IK naiver BZ: n= 5; IK CpG stimulierter BZ: n= 6
ADR= Adrenerger Rezeptor; BZ= B-Zellen; IK= Intrazelluläres Kompartiment; MFI= Mittlere Fluoreszenzintensität; PM= Plasmamembran

3.2 Zytokinproduktion *CD*19+, CpG-aktivierter humaner B-Zellen unter Stimulation mit adrenergen Rezeptor-Agonisten und Antagonisten

Nachdem die Expression der adrenergen Rezeptorsubtypen auf der Plasmamembran und im intrazellulären Kompartiment der naiven und CpG-stimulierten BZ dargestellt werden konnte, sollte in einem nächsten Schritt die Relevanz dieser Rezeptoren für die Immunmodulation beschrieben werden. Zur Analyse des pro- oder antiinflammatorischen Effekts der BZ wurden die adrenergen Rezeptorsubtypen mit CpG und verschiedenen Rezeptor-Liganden mit unterschiedlicher Rezeptoraffinität und Rezeptorwirkung stimuliert und in den Überständen mittels *ELISA* die Interleukinproduktion gemessen. Als relevante Enzyme für den BZ-Stoffwechsel wurden hier die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF-*α*, sowie das antiinflammatorische Zytokin IL-10 ausgewählt. Deren Konzentration wurde bestimmt und mit den Konzentrationen der Kontrollgruppe verglichen. Als Kontrollgruppe galten BZ, welche nur mit CpG stimuliert wurden.

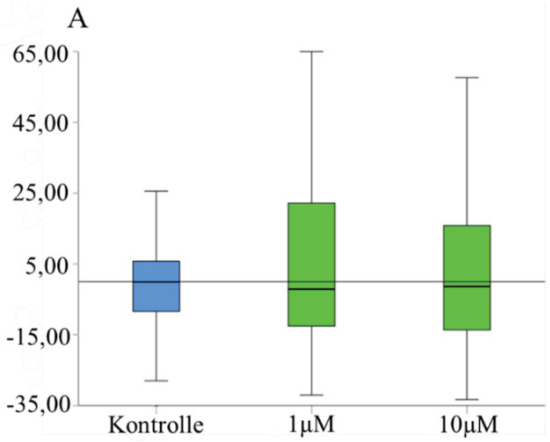
3.2.1 Einfluss *α*1-ADRs auf die IL-6-/ IL-10-Produktion

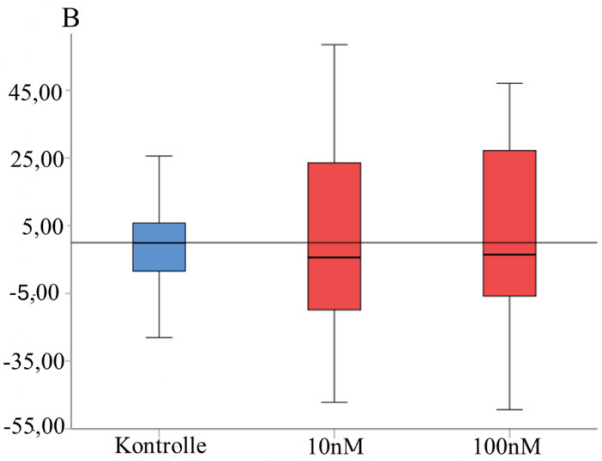
Zunächst wurde die Modulation der CpG-bedingten Zytokinproduktion durch Ligation des *α*1-ADR mittels Phenylephrine (Phen), einem *α*1-ADR-Agonisten und Doxazosin (Doxa),

einem α1-ADR-Antagonisten untersucht. Die Produktion von IL-6 wurde dabei weder durch Phen (**Abb. 14 A**), noch durch Doxa (**Abb. 14 B**) signifikant moduliert. Auch die Kombination von Phen und Doxa zeigte keinen Einfluss auf die IL-6 Produktion (**Abb. 14 C**).

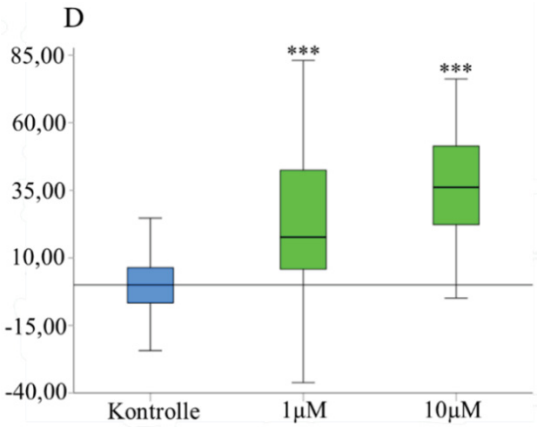
Bei der Stimulation mit Phen ($p \leq 0{,}001$; **Abb. 14 D**), jedoch nicht mit Doxa (**Abb. 14 E**), zeigte sich in allen eingesetzten Konzentrationen verglichen zur Kontrolle eine signifikant erhöhte IL-10-Produktion. Der stimulierende Effekt von Phen (1 µM) auf die IL-10-Synthese wurde durch Ko-Inkubation mit Doxa (100 nM) zunächst nicht antagonisiert, es zeigte sich weiterhin ein signifikanter IL-10-Anstieg ($p = 0{,}01$; **Abb. 14 F**). Bei der Kombination von Phen (10 µM) und Doxa (100 nM) zeigte sich jedoch kein signifikanter Anstieg der IL-10-Konzentration mehr verglichen zur Kontrolle ($p = 0{,}181$; **Abb. 14 F**).

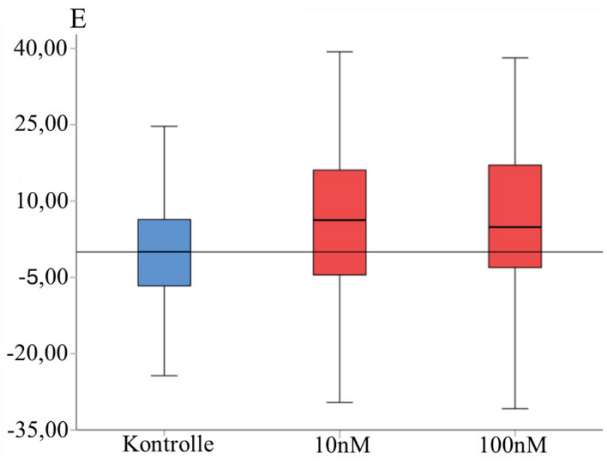
% IL-6 relativ zur Kontrolle

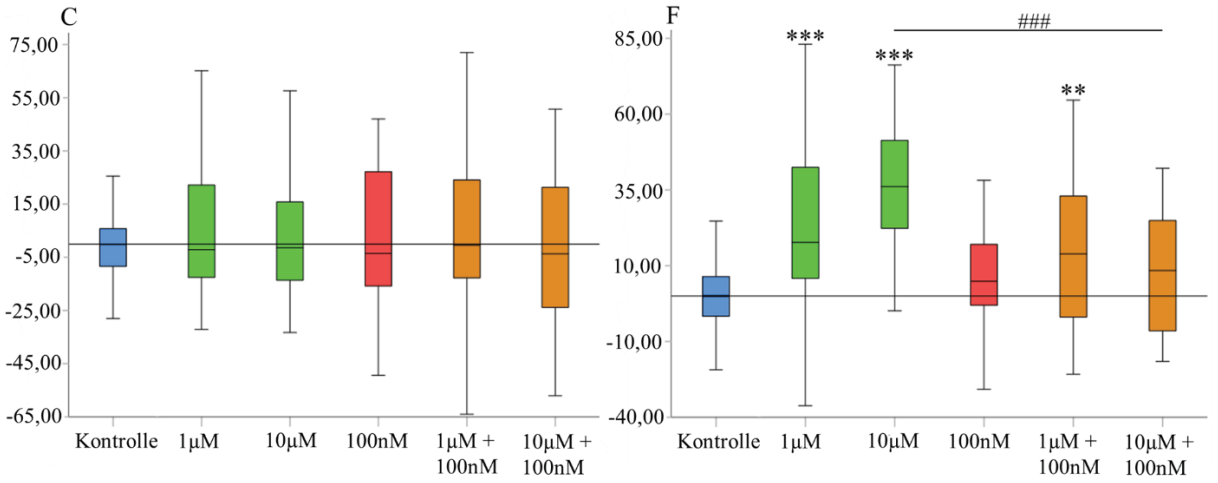




% IL-10 relativ zur Kontrolle







Kontrolle
Phenylephrine (α1-ADR-Agonist)
Doxazosin (α1-ADR-Antagonist)
Phenylephrine + Doxazosin

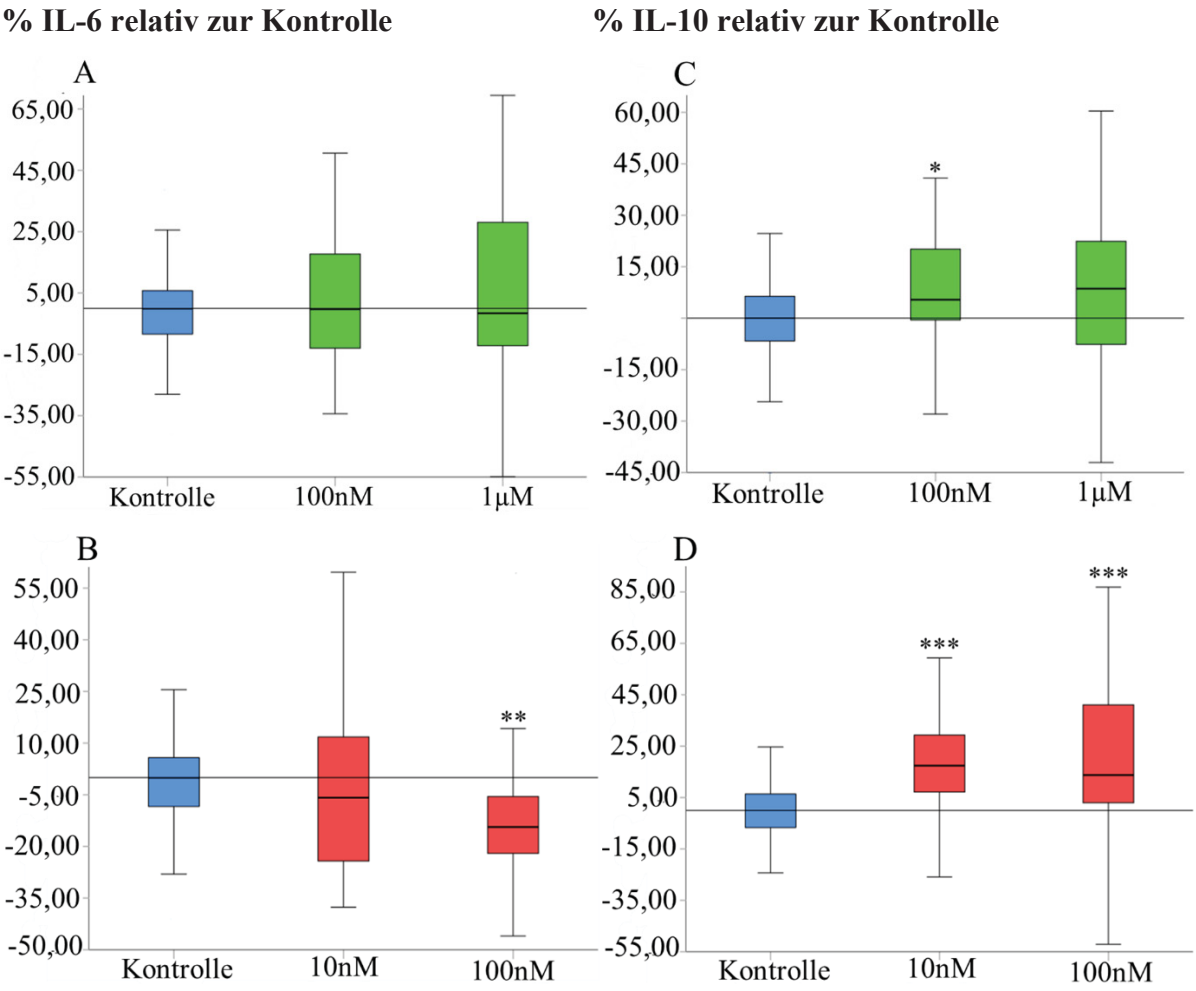
Abb. 14: Einfluss der α1-ADRs auf die IL-6-/ IL-10-Produktion humaner B-Zellen
A-F: IL-6- (**A-C**) und IL-10- (**D-F**) Produktion humaner B-Zellen über 48 h. B-Zellen wurden mit CpG aktiviert und zusätzlich mit Phen (α1-Agonist) (**A, D**), Doxa (α1-Antagonist) (**B, E**) oder beidem (**C, F**) stimuliert. Die Zytokinproduktion wurde mittels *ELISA* in den Überständen bestimmt. Alle Werte sind prozentual in Relation zur Kontrolle (nur CpG) dargestellt. Der Kruskal-Wallis-Tests mit Bonferroni-Korrektur wurde für alle Vergleiche (ADR-Stimulation *versus* Kontrolle und ADR-Stimulationen untereinander) angewendet. Das Signifikanzniveau betrug $p < 0,05$. *p= 0,05-0,01; **p= 0,01-0,001; ***p≤ 0,001 beim Vergleich zur Kontrolle. #p= 0,05-0,01; ##p= 0,01-0,001; ###p≤ 0,001 beim Vergleich der Stimulationsgruppen untereinander.
Kontrolle: n= 55; Phen: 1 µM: n= 11; 10 µM: n= 11; Doxa: 10 nM: n= 10; 100 nM: n= 10; Phen + Doxa: 1 µM + 100 nM: n= 11; 10 µM + 100 nM: n= 11
ADR= Adrenerger Rezeptor; Doxa= Doxazosin; *ELISA= Enzyme-linked Immunosorbent Assay*; IL= Interleukin; Phen= Phenylephrine

Die deskriptiven Statistiken zu den untersuchten Gruppen sind im Anhang in **Tabelle 19** (IL-6) und **Tabelle 20** (IL-10) dargestellt, die Ergebnisse der durchgeführten KW-Tests in **Tabelle 21** und die der paarweisen Gruppenvergleiche in **Tabelle 22** (IL-10).

3.2.2 Einfluss α2-ADRs auf die IL-6-/ IL-10-Produktion

In einem weiteren Schritt wurde der Effekt des α2-ADR-Agonisten Dexmedetomidine (Dex) und des α2-ADR-Antagonisten RS-79948 (RS) auf die Zytokinproduktion untersucht.
Die IL-6-Produktion wurde durch die Zugabe von Dex im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant moduliert. (**Abb. 15 A**). Bei Stimulation der BZ mit 100 nM RS konnte hingegen eine signifikante Verminderung der IL-6-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (p= 0,001; **Abb. 15 B**).
Es ergab sich verglichen zur Kontrollgruppe ein signifikanter Anstieg der IL-10-Konzentrationen bei Stimulation der BZ mit 10 nM Dex (p= 0,047; **Abb. 15 C**), 10 nM RS (p≤ 0,001) und 100 nM RS (p≤ 0,001; **Abb. 15 D**).

Die deskriptiven Statistiken zu den untersuchten Gruppen sind im Anhang in **Tabelle 23** (IL-6) und **Tabelle 24** (IL-10) dargestellt, die Ergebnisse der durchgeführten KW-Tests in **Tabelle 25** und die der paarweisen Gruppenvergleiche in **Tabelle 26** (IL-6) und **Tabelle 27** (IL-10).



Kontrolle
Dexmedetomidine (α2-ADR-Agonist)
RS-79948 (α2-ADR-Antagonist)

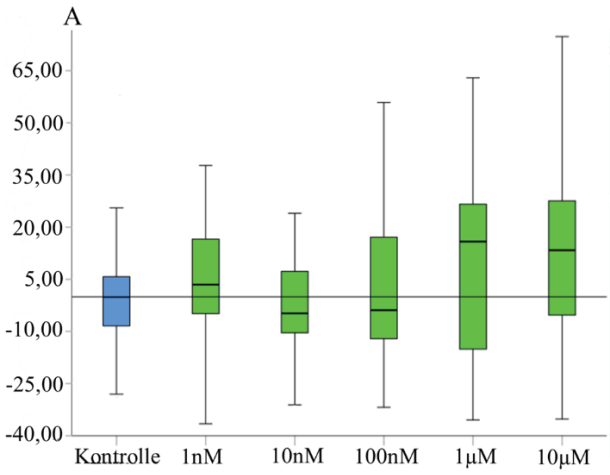
Abb. 15: Einfluss der α2-ADRs auf die IL-6-/ IL-10-Produktion humaner B-Zellen
A-D: IL-6- (**A, B**) und IL-10- (**C, D**) Produktion humaner B-Zellen über 48 h. B-Zellen wurden mit CpG aktiviert und zusätzlich mit Dex (α2-Agonist) (**A, C**) oder RS (α2-Antagonist) (**B, D**) stimuliert. Die Zytokinproduktion wurde mittels *ELISA* in den Überständen bestimmt. Alle Werte sind prozentual in Relation zur Kontrolle (nur CpG) dargestellt. Der Kruskal-Wallis-Tests mit Bonferroni-Korrektur wurde für alle Vergleiche (ADR-Stimulation *versus* Kontrolle und ADR-Stimulationen untereinander) angewendet. Das Signifikanzniveau betrug $p < 0,05$. *p= 0,05-0,01; **p= 0,01-0,001; ***p≤ 0,001 beim Vergleich zur Kontrolle. #p= 0,05-0,01; ##p= 0,01-0,001; ###p≤ 0,001 beim Vergleich der Stimulationsgruppen untereinander.
Kontrolle: n= 55; Dex: 100 nM: n= 10; 1 µM: n= 10; RS: 10 nM: n= 9; 100 nM: n= 10
ADR= Adrenerger Rezeptor; Dex= Dexmedetomidine; *ELISA= Enzyme-linked Immunosorbent Assay*; IL= Interleukin; RS= RS-79948

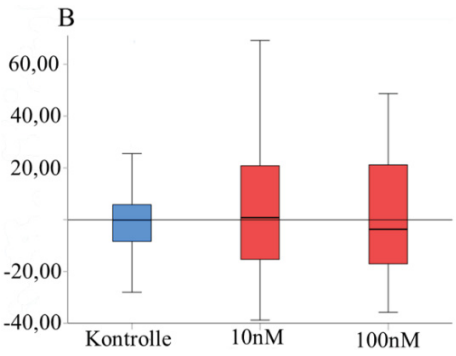
3.2.3 Einfluss β-ADRs auf die IL-6-/ IL-10-Produktion

Weiterführend wurde der Einfluss der adrenergen β-Rezeptoren-Stimulation auf die Modulation der Zytokinproduktion untersucht. Dazu wurden zunächst der β-ADR-Agonist Isoproterenol (Iso) und der β-ADR-Antagonist Nadolol (Nad) verwendet. Sowohl die

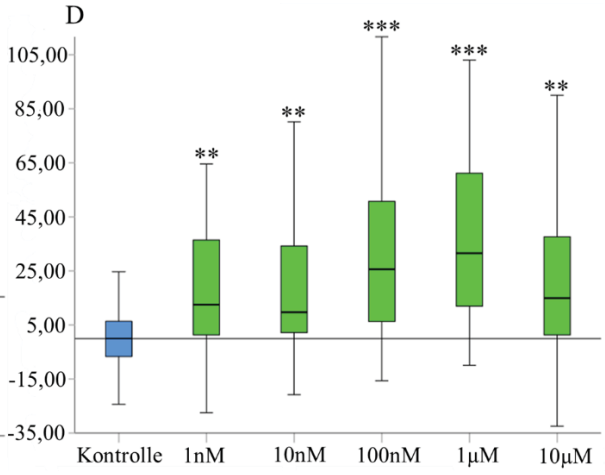
Stimulation mit Iso (**Abb. 16 A**), mit Nad (**Abb. 16 B**), als auch die Ko-Inkubation mit Iso und Nad (**Abb. 16 C**) zeigten im Vergleich zur Kontrolle in allen eingesetzten Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf die Modulation der CpG-bedingten IL-6-Produktion.
Allerdings zeigte sich, verglichen zur alleinigen Stimulation mit CpG, ein signifikanter Anstieg der IL-10-Konzentration bei Stimulation der BZ sowohl mit Iso (1 nM, 10 µM: $p = 0{,}001$; 10 nM: $p = 0{,}002$; 100 nM, 1µM: $p \leq 0{,}001$; **Abb. 16 D**), als auch mit Nad ($p \leq 0{,}001$; **Abb. 16 E**). Bei der Kombination von Iso und Nad konnte der stimulierende Effekt beider Substanzen auf die IL-10 Produktion nicht mehr nachgewiesen werden (**Abb. 16 F**).
Die deskriptiven Statistiken zu den untersuchten Gruppen sind im Anhang in **Tabelle 28** (IL-6) und **Tabelle 29** (IL-10) dargestellt, die Ergebnisse der durchgeführten KW-Tests in **Tabelle 30** und die der paarweisen Gruppenvergleiche in **Tabelle 31** (IL-10).

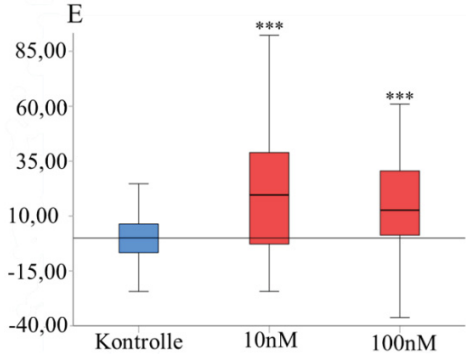
% IL-6 relativ zur Kontrolle

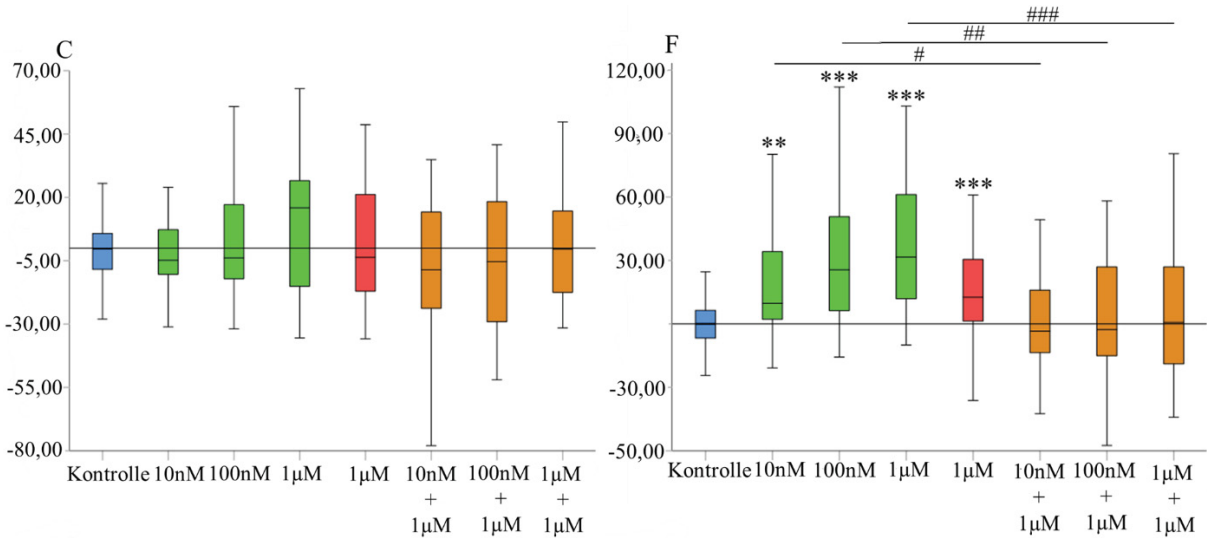




% IL-10 relativ zur Kontrolle







Kontrolle
Isoproterenol (*β*-ADR-Agonist)
Nadolol (*β* -ADR-Antagonist)
Isoproterenol + Nadolol

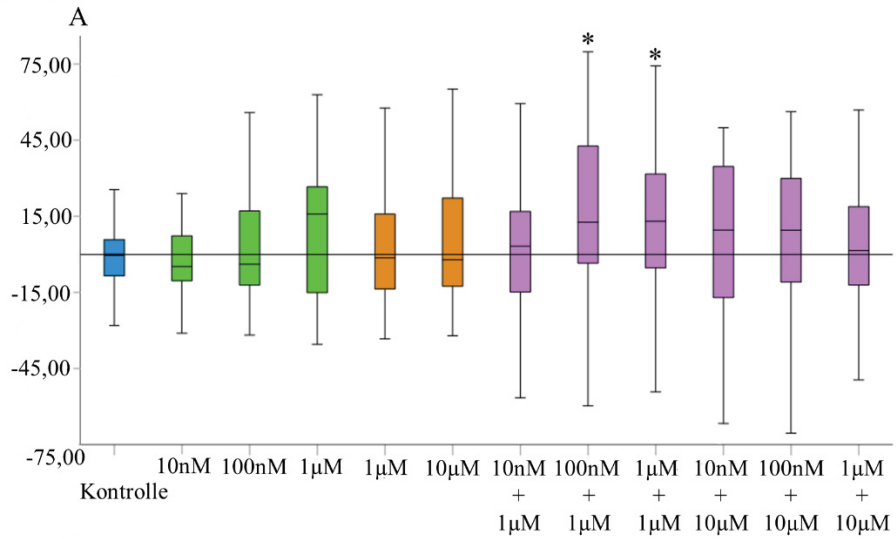
Abb. 16: Einfluss der *β*-ADRs auf die IL-6-/ IL-10-Produktion humaner B-Zellen
A-F: IL-6- (**A-C**) und IL-10- (**D-F**) Produktion humaner B-Zellen über 48 h. B-Zellen wurden mit CpG aktiviert und zusätzlich mit Iso (*β*-Agonist) (**A, D**), Nad (*β*-Antagonist) (**B, E**) oder beidem (**C, F**) stimuliert. Die Zytokinproduktion wurde mittels *ELISA* in den Überständen bestimmt. Alle Werte sind prozentual in Relation zur Kontrolle (nur CpG) dargestellt. Der Kruskal-Wallis-Tests mit Bonferroni-Korrektur wurde für alle Vergleiche (ADR-Stimulation *versus* Kontrolle und ADR-Stimulationen untereinander) angewendet. Das Signifikanzniveau betrug $p < 0,05$. *p= 0,05-0,01; **p= 0,01-0,001; ***p≤ 0,001 beim Vergleich zur Kontrolle. #p= 0,05-0,01; ##p= 0,01-0,001; ###p≤ 0,001 beim Vergleich der Stimulationsgruppen untereinander.
Kontrolle: n= 55; Iso: 1 nM: n= 10; 10 nM: n= 11; 100 nM: n= 11; 1 µM: n= 11; 10 µM: n= 11; Nad: 100 nM: n= 11; 1 µM: n= 11; Iso + Nad: 10 nM+ 1 µM: n= 11; 100 nM + 1 µM: n= 11; 1 µM + 1 µM: n= 11
ADR= Adrenerger Rezeptor; *ELISA= Enzyme-linked Immunosorbent Assay*; IL= Interleukin; Iso= Isoproterenol; Nad= Nadolol

Da sowohl Iso als auch Phen die IL-10-Produktion erhöhten, wurden beide Substanzen kombiniert, um mögliche additive oder synergistische Effekte zu untersuchen. Während Iso und Phen einzeln die IL-6-Produktion nicht beeinflussen, zeigte sich bei der Kombination aus Iso (100 nM und 1µM) mit Phen (1 µM) eine Steigerung der IL-6-Synthese (p= 0,018 bei 100 nM Iso + 1 µM Phen und p= 0,037 bei 1 µM Iso + 1µM Phen) (**Abb. 17 A**).

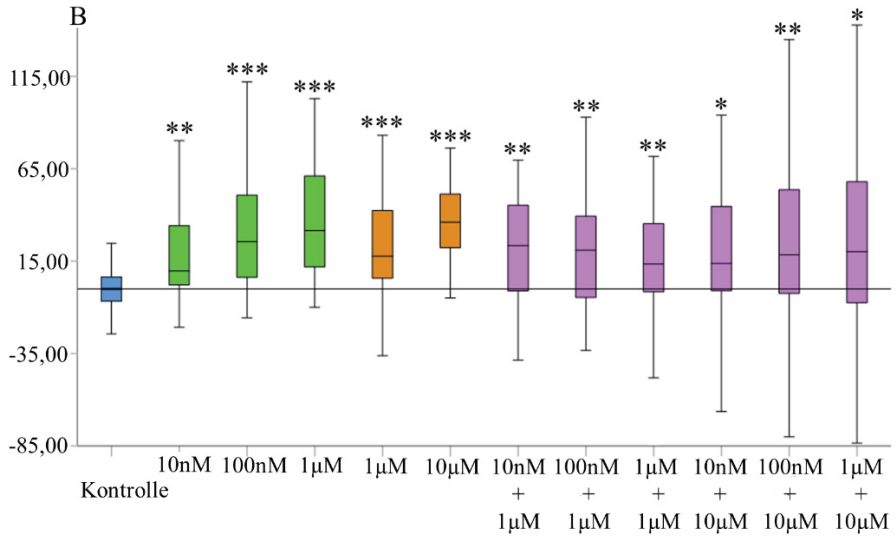
Wie schon in **Abb. 14 D** und **Abb. 16 D** gezeigt, erhöhte sowohl Phen als auch Iso allein die IL-10-Produktion verglichen zur Kontrollgruppe. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch in der Kombination aus Iso und Phen (Iso 10 nM + Phen 1µM, Iso 100nM + Phen 1µM: p= 0,001; Iso 1 µM + Phen 1 µM: p= 0,004; Iso 10 nM + Phen 10 µM: p= 0,013; Iso 100 nM + Phen 10 µM: p= 0,003; Iso 1 µM + Phen 10 µM: p= 0,04), allerdings ohne Unterschied verglichen zu den Stimulationen mit Iso und Phen allein (**Abb. 17 B**).

Die deskriptiven Statistiken zu den untersuchten Gruppen sind im Anhang in **Tabelle 32** (IL-6) und **Tabelle 33** (IL-10) dargestellt, die Ergebnisse der durchgeführten KW-Tests in **Tabelle 34** und die der paarweisen Gruppenvergleiche in **Tabelle 35** (IL-6) und **Tabelle 36** (IL-10).

% IL-6 relativ zur Kontrolle



% IL-10 relativ zur Kontrolle



Kontrolle
Isoproterenol (*β*-ADR-Agonist)
Phenylephrine (*α*1-ADR-Agonist)
Isoproterenol + Phenylephrine

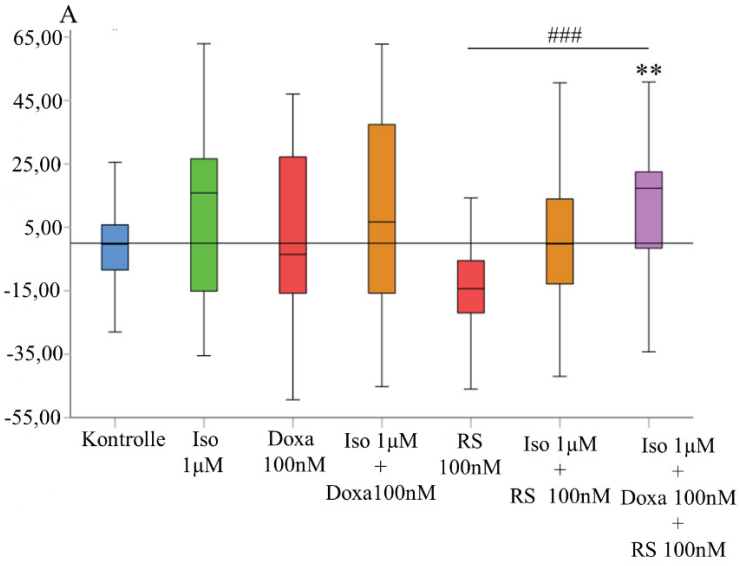
Abb. 17: Einfluss der *β*- und *α*1-ADR-Ko-Stimulation auf die IL-6-/ IL-10-Produktion humaner B-Zellen
A,B: IL-6- (**A**) und IL-10- (**B**) Produktion humaner B-Zellen über 48 h. B-Zellen wurden mit CpG aktiviert und zusätzlich mit Iso (*β*-Agonist) in Kombination mit Phen (*α*1-Agonist) stimuliert. Die Zytokinproduktion wurde mittels *ELISA* in den Überständen bestimmt. Alle Werte sind prozentual in Relation zur Kontrolle (nur CpG) dargestellt. Der Kruskal-Wallis-Tests mit Bonferroni-Korrektur wurde für alle Vergleiche (ADR-Stimulation *versus* Kontrolle und ADR-Stimulationen untereinander) angewendet. Das Signifikanzniveau betrug $p < 0,05$. *p= 0,05-0,01; **p= 0,01-0,001; ***p≤ 0,001 beim Vergleich zur Kontrolle. #p= 0,05-0,01; ##p= 0,01-0,001; ###p≤ 0,001 beim Vergleich der Stimulationsgruppen untereinander.
Kontrolle: n= 55; Iso: 10 nM: n= 11; 100 nM: n= 11; 1 µM: n= 11; Phen: 1 µM: n= 11; 10 µM: n= 11; Iso + Phen: 10 nM + 1 µM: n= 11 100 nM + 1 µM: n= 11; 1 µM + 1 µM: n= 11; 10 nM + 10 µM: n= 11; 100 nM + 10 µM: n= 11; 1 µM + 10 µM: n= 11
ADR= Adrenerger Rezeptor; *ELISA= Enzyme-linked Immunosorbent Assay*; IL= Interleukin; Iso= Isoproterenol; Phen= Phenylephrine

Des Weiteren wurde Iso mit dem α1-ADR-Antagonisten Doxa und/oder dem α2-ADR-Antagonisten RS kombiniert, um einen Einfluss von Iso auf α-ADRs auszuschließen. Die IL-6-Produktion ließ sich weder durch Iso, RS oder Doxa allein, noch durch die Kombination von Iso und Doxa oder Iso und RS modulieren (**Abb. 18 A**). Allerdings zeigte die kombinierte Stimulation mit Iso, RS und Doxa eine Steigerung der IL-6-Produktion im Verglich zur Kontrolle mit CpG (p= 0,003) oder RS allein (p≤ 0,001) (**Abb. 18 A**).

Die IL-10-Produktion ließ sich in allen drei Ansätzen der Ko-Inkubation mit Iso, Doxa und/oder RS erhöhen (p≤ 0,001; (**Abb. 18 B**). Die IL-10-Produktion, die durch Iso gesteigert wurde, ließ sich nicht durch Doxa oder RS inhibieren. Die kombinierten Stimulationen mit Iso und Doxa, sowie Iso, Doxa und RS zeigten im Vergleich zur alleinigen Simulation mit Doxa signifikant erhöhte IL-10-Produktionen (Iso + Doxa: p= 0,004; Iso + Doxa + RS: p= 0,002).

Die deskriptiven Statistiken zu den untersuchten Gruppen sind im Anhang in **Tabelle 37** (IL-6) und **Tabelle 38** (IL-10) dargestellt, die Ergebnisse der durchgeführten KW-Tests in **Tabelle 39** und die der paarweisen Gruppenvergleiche in **Tabelle 40** (IL-6) und **Tabelle 41** (IL-10).

% IL-6 relativ zur Kontrolle



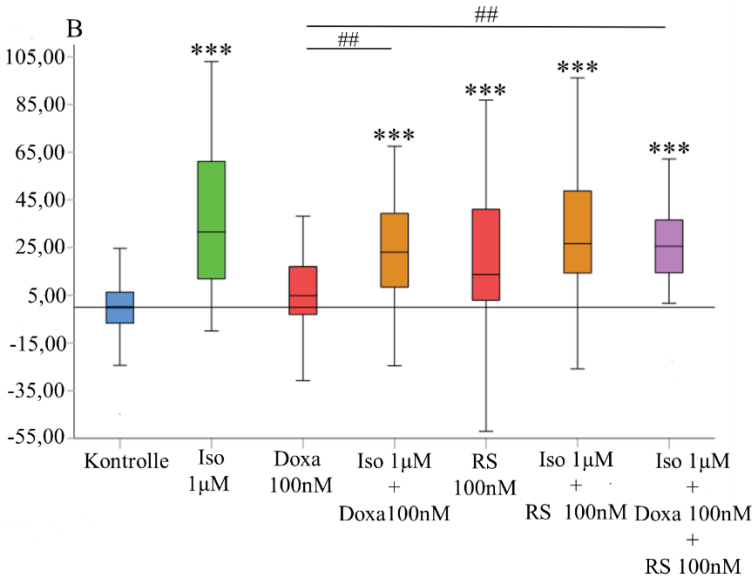


Abb. 18: Einfluss der *β*-ADRs auf die IL-6-/ IL-10-Produktion humaner B-Zellen unter Inhibition *α*1- und *α*2-ADRs

A,B: IL-6- (**A**) und IL-10- (**B**) Produktion humaner B-Zellen über 48 h. B-Zellen wurden mit CpG aktiviert und zusätzlich mit Iso (*β*-Agonist) in Kombination mit Doxa (*α*1-Antagonist) und RS (*α*2-Antagonist) stimuliert. Die Zytokinproduktion wurde mittels *ELISA* in den Überständen bestimmt. Alle Werte sind prozentual in Relation zur Kontrolle (nur CpG) dargestellt. Der Kruskal-Wallis-Tests mit Bonferroni-Korrektur wurde für alle Vergleiche (ADR-Stimulation *versus* Kontrolle und ADR-Stimulationen untereinander) angewendet. Das Signifikanzniveau betrug $p < 0,05$. *p= 0,05-0,01; **p= 0,01-0,001; ***p≤ 0,001 beim Vergleich zur Kontrolle. #p= 0,05-0,01; ##p= 0,01-0,001; ###p≤ 0,001 beim Vergleich der Stimulationsgruppen untereinander.
Kontrolle: n= 55; Iso: 1 µM: n= 11; Doxa: 100 nM: n= 10; RS: 100 nM: n= 10; Iso + Doxa: 1 µM + 100 nM: n= 10; Iso + RS: 1 µM + 100 nM: n= 10; Iso + Doxa + RS: 1µM + 100 nM+ 100 nM: n= 10
ADR= Adrenerger Rezeptor; Doxa= Doxazosin; *ELISA= Enzyme-linked Immunosorbent Assay*; IL= Interleukin; Iso= Isoproterenol; RS= RS-79948

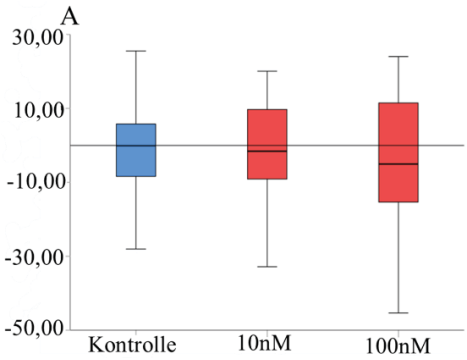
Da Nad unselektiv alle *β*-ADRs antagonisiert, wurden im nächsten Schritt die Effekte des selektiven *β*2-Antagonisten ICI-118,551 (ICI) und des selektiven *β*3-Antagonisten L-748,337 **(**L) allein und in Kombination mit Iso untersucht. Während ICI allein die IL-6-Produktion nicht modulierte (**Abb. 19 A**), inhibierte L in der höchsten eingesetzten Konzentration die IL-6-Synthese (1 µM: p≤ 0,001, **Abb. 19 B**). Die gemeinsame Stimulation der BZ mit Iso und ICI bewirkten hingegen eine Erhöhung der IL-6-Produktion im Vergleich zur Kontrolle in allen eingesetzten Konzentrationen (Iso 10 nM + ICI 10 nM: p= 0,04; Iso 100 nM + ICI 10 nM: p= 0,002; Iso 1 µM + ICI 10 nM: p= 0,021, **Abb. 19 C**), obwohl Iso (siehe **Abb. 16 A**) und ICI (siehe **Abb. 19 A**) alleine keine Modulation der IL-6-Produktion bewirkten. Ebenfalls ließen sich signifikant erhöhte IL-6-Konzentrationen bei der Ko-Stimulation im Verglich zur alleinigen Stimulation nur mit Iso oder nur mit ICI in denselben Konzentrationen nachweisen (Iso 10 nM: p= 0,04; Iso 100 nM: p= 0,032, Vergleich ICI 10 nM mit Iso 100 nM + ICI 10 nM: p= 0,027). Auch die kombinierte Stimulation mit Iso und L bewirkte eine Hochregulation der IL-6-Produktion verglichen zur Kontrolle (Iso 100 nM +

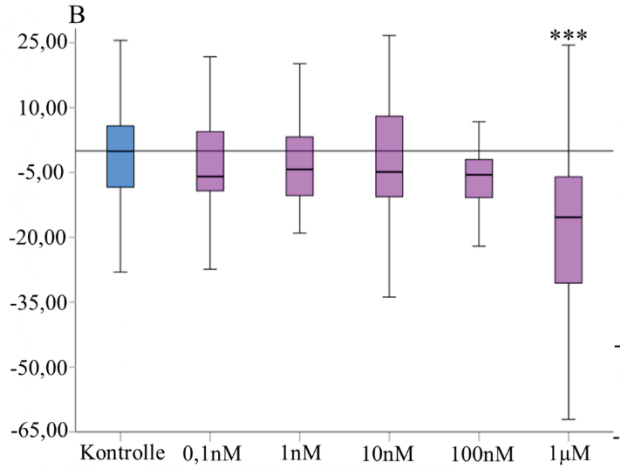
L 50 nM: p= 0,007; Iso 1 µM + L 50 nM: p= 0,026) und verglichen zur alleinigen Stimulation mit L, welches allein keine Modulation der IL-6-Produktion bewirkte (siehe **Abb. 19 B**).

Auch die IL-10-Produktion wurde durch Stimulation allein mit ICI nicht beeinflusst (**Abb. 19 D**), jedoch durch L in der geringsten eingesetzten Konzentration leicht, aber signifikant erhöht (0,1 nM: p= 0,042, **Abb. 19 E**). Durch die gemeinsame Stimulation mit Iso und ICI wurde weiterhin eine Hochregulation der IL-10-Produktion im Vergleich zur Kontrolle (p≤ 0,001) und im Vergleich zur Stimulation mit ICI 10 nM (Iso 10nM + ICI 10nM: p= 0,019; Iso 100 nM + ICI 10 nM ; p= 0,012; Iso 1 µM + ICI 10 nM: p= 0,006) moduliert (**Abb. 19 F**). Die im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöhten IL-10-Produktionen durch Iso ließen sich hingegen durch die Ko-Inkubation mit L antagonisieren. Es zeigte sich ein signifikanter Abfall der Konzentration bei kombinierter Stimulation mit Iso und L im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Iso in derselben Konzentration (Iso 100 nM + L 50 nM: p= 0,007; Iso + L 50 nM: p≤ 0,001).

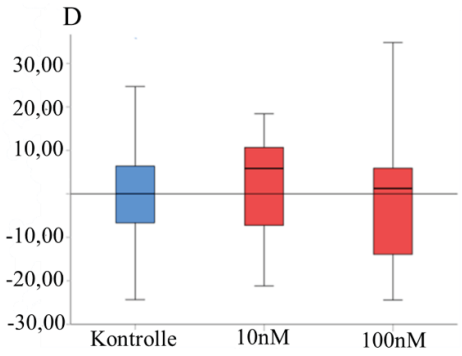
Die deskriptiven Statistiken zu den untersuchten Gruppen sind im Anhang in **Tabelle 42** (IL-6) und **Tabelle 43** (IL-10) dargestellt, die Ergebnisse der durchgeführten KW-Tests in **Tabelle 44** und die der paarweisen Gruppenvergleiche in **Tabelle 45** (IL-6) und **Tabelle 46** (IL-10).

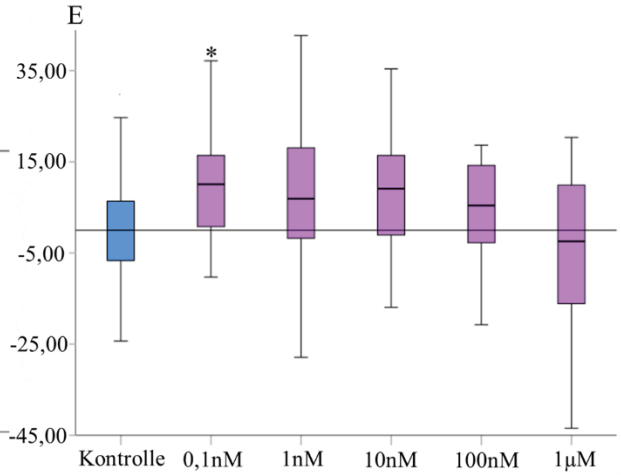
% IL-6 relativ zur Kontrolle



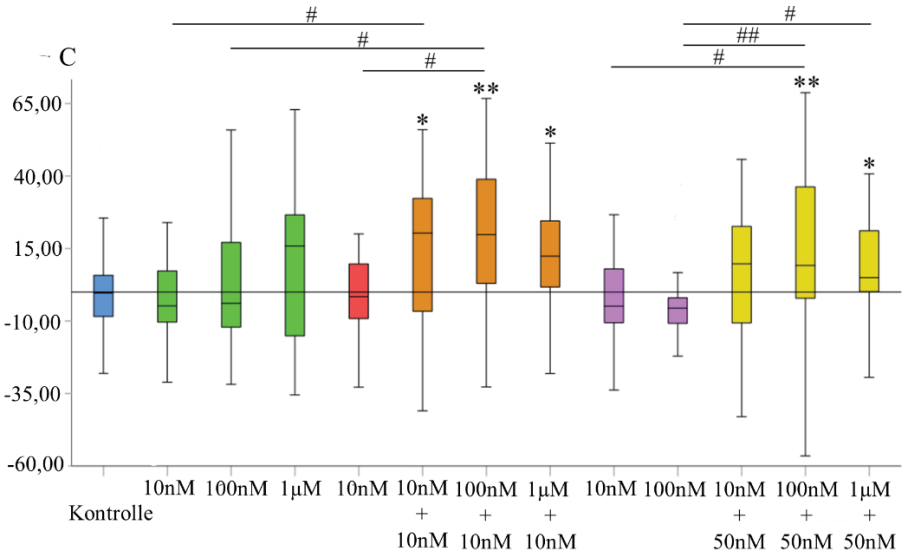


% IL-10 relativ zur Kontrolle

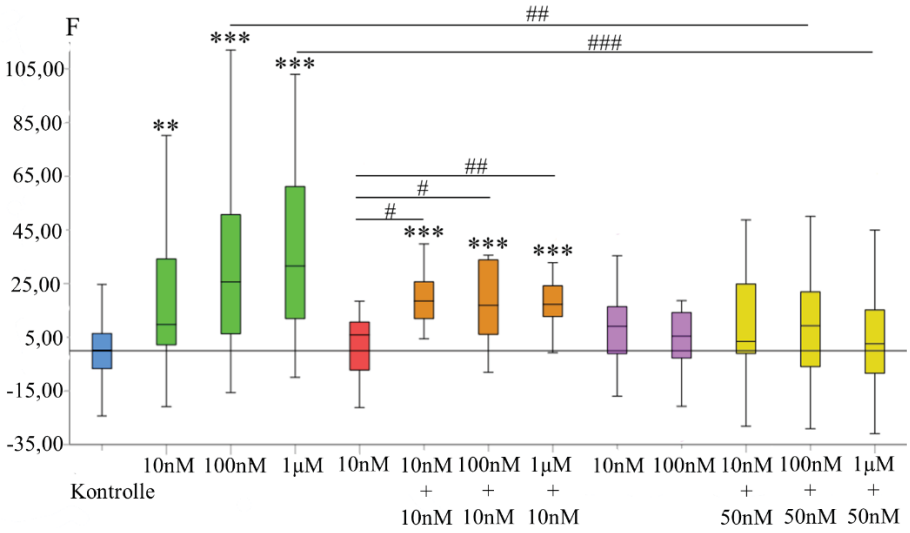




% IL-6 relativ zur Kontrolle



% IL-10 relativ zur Kontrolle



Kontrolle
ICI-118,551 (*β*2-Antagonist)
L-748,337 (*β*3-Antagonist)
Isoproterenol (*β*-ADR-Agonist)
Isoproterenol + ICI-118,551
Isoproterenol + L-748,337

Abb. 19: Einfluss der Antagonisierung spezifischer *β*-ADRs auf die IL-6-/ IL-10-Produktion humaner B-Zellen

A-F: IL-6- (**A-C**) und IL-10- (**D-F**) Produktion humaner B-Zellen über 48 h. B-Zellen wurden mit CpG aktiviert und zusätzlich mit ICI (*β2*-Antagonist) (**A, D**), L (*β3*-Antagonist) (**B, E**) oder beide jeweils in Kombination mit Iso (**C, F**) stimuliert. Die Zytokinproduktion wurde mittels *ELISA* in den Überständen bestimmt. Alle Werte sind prozentual in Relation zur Kontrolle (nur CpG) dargestellt. Der Kruskal-Wallis-Tests mit Bonferroni-Korrektur wurde für alle Vergleiche (ADR-Stimulation *versus* Kontrolle und ADR-Stimulationen untereinander) angewendet. Das Signifikanzniveau betrug $p < 0,05$. *p= 0,05-0,01; **p= 0,01-0,001; ***p≤ 0,001 beim Vergleich zur Kontrolle. #p= 0,05-0,01; ##p= 0,01-0,001; ###p≤ 0,001 beim Vergleich der Stimulationsgruppen untereinander.

Kontrolle: n= 55; ICI: 10 nM: n= 10; 100 nM: n= 10; L: 0,1 nM: n= 10; 1 nM: n= 10; 10 nM: n= 10; 100 nM: n= 10; 1 µM: n= 10; Iso: 10 nM: n= 11; 100 nM: n= 11; 1 µM: n= 11; Iso + ICI: 10 nM + 10 nM: n= 8; 100 nM + 10 nM: n= 9; 1 µM + 10 nM: n= 9; Iso + L: 10 nM + 50 nM: n= 9; 100 nM + 50 nM: n= 9; 1 µM + 50 nM: n= 9

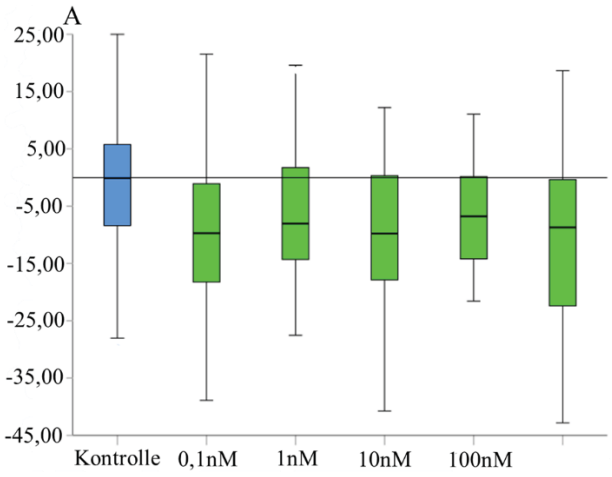
ADR= Adrenerger Rezeptor; *ELISA= Enzyme-linked Immunosorbent Assay*; ICI= ICI-118,551; IL= Interleukin; Iso= Isoproterenol; L= L-748,337

In **Abb. 19 F** konnte gezeigt werden, dass der stimulierende Effekt von Iso auf die IL-10-Produktion durch den *β*3-Antagonisten L inhibiert werden konnte. Um den Einfluss des *β*3-ADRs zu untersuchen, wurde des Weiteren der selektive *β*3-Agonist BRL-37344 (BRL) verwendet. Die IL-6-Produktion wurde dabei nicht von BRL (**Abb. 20 A**), ICI (*β*2-Antagonist) oder L (*β*3-Antagonist) (**Abb. 19 C**) allein moduliert. Allerdings ergab die Kombinationen aus BRL und ICI sowie BRL und L höhere IL-6-Produktionen im Vergleich zu BRL allein (BRL 10 nM + ICI 10 nM, BRL 1 µM + ICI 10 nM: p= 0,003; BRL 100 nM + ICI 10 nM, BRL 10 nM + L 50 nM: p= 0,014; BRL 1 µM + L 50 nM: p= 0,037, **Abb. 20 B**).

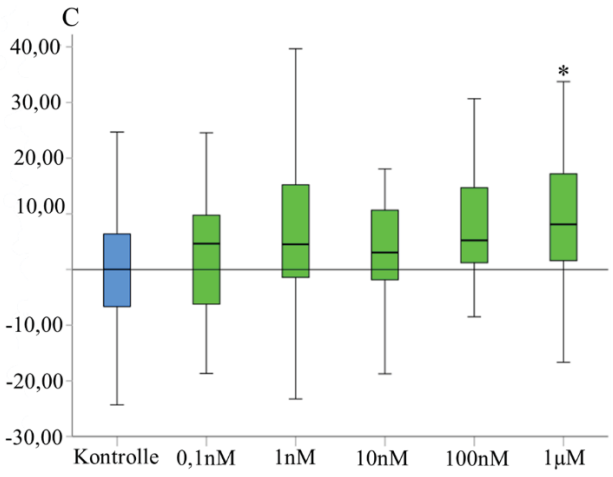
BRL erhöhte sowohl allein (1 µM: p= 0,025, **Abb. 20 C**), als auch in Kombination mit dem *β*2-Antagonisten ICI die CpG-induzierte IL-10-Produktion von BZ (BRL 10 nM + ICI 10 nM: p= 0,001; BRL 100 nM + ICI 10 nM: p= 0,004; BRL 1 µM + ICI 10 nM: p= 0,011, **Abb. 20 D**). Verglichen mit BRL (10 nM) allein führte die Kombination mit ICI 10 nM zu einer signifikanten Erhöhung der IL-10 Produktion (p= 0,046). Eine Ko-Inkubation von BRL und L führte zu keiner Steigerung der IL-10-Produktion, jedoch zeigte sich eine signifikante Reduktion verglichen zu BRL 1 µM, wenn BRL (1 µM) zusammen mit L (50 nM) inkubiert wurde (p= 0,025).

Die deskriptiven Statistiken zu den untersuchten Gruppen sind im Anhang in **Tabelle 47** (IL-6) und **Tabelle 48** (IL-10) dargestellt, die Ergebnisse der durchgeführten KW-Tests in **Tabelle 49** und die der paarweisen Gruppenvergleiche in **Tabelle 50** (IL-6) und **Tabelle 51** (IL-10).

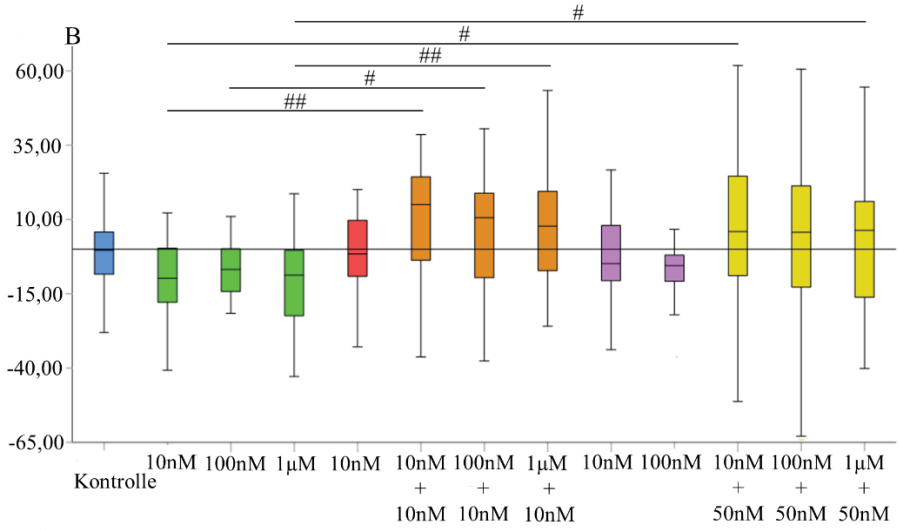
% IL-6 relativ zur Kontrolle



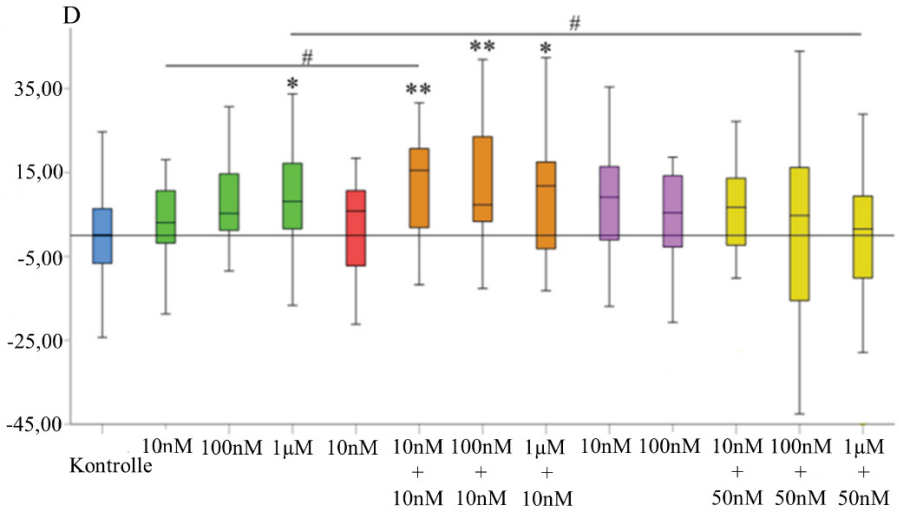
% IL-10 relativ zur Kontrolle



% IL-6 relativ zur Kontrolle



% IL-10 relativ zur Kontrolle



Kontrolle
BRL-37355 (*β*3-ADR-Agonist)
ICI-118,551 (*β*2-Antagonist)
L-748,337 (*β*3-Antagonist)
BRL-37355 + ICI-118,551
BRL-37355 + L-748,337

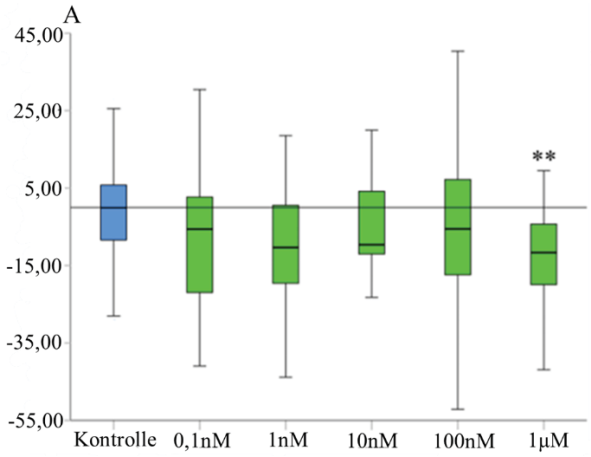
Abb. 20: Einfluss der *β*3-ADRs auf die IL-6-/ IL-10-Produktion humaner B-Zellen
A-D: IL-6- (**A,B**) und IL-10- (**C,D**) Produktion humaner B-Zellen über 48 h. B-Zellen wurden mit CpG aktiviert und zusätzlich mit BRL (*β*3-Agonist) (**A,C**) und jeweils in Kombination mit ICI (*β*2-Antagonist) und L (*β*3-Antagonist) (**B,D**) stimuliert. Die Zytokinproduktion wurde mittels *ELISA* in den Überständen bestimmt. Alle Werte sind prozentual in Relation zur Kontrolle (nur CpG) dargestellt. Der Kruskal-Wallis-Tests mit Bonferroni-Korrektur wurde für alle Vergleiche (ADR-Stimulation *versus* Kontrolle und ADR-Stimulationen untereinander) angewendet. Das Signifikanzniveau betrug $p < 0,05$. *p= 0,05-0,01; **p= 0,01-0,001; ***p≤ 0,001 beim Vergleich zur Kontrolle. #p= 0,05-0,01; ##p= 0,01-0,001; ###p≤ 0,001 beim Vergleich der Stimulationsgruppen untereinander.
Kontrolle: n= 55; BRL: 0,1 nM: n= 10; 1 nM: n= 10; 10 nM: n= 10; 100 nM: n= 10; 1 µM: n= 10; ICI: 10 nM: n= 10; L: 10 nM: n= 10; 100 nM: n= 10; BRL + ICI: 10 nM + 10 nM: n= 9; 100 nM + 10 nM: n= 9; 1 µM + 10 nM: n= 9; BRL + L: 10 nM + 50 nM: n= 9; 100 nM + 50 nM: n= 9; 1 µM + 50 nM: n= 9
ADR= Adrenerger Rezeptor; BRL= BRL-37344; *ELISA= Enzyme-linked Immunosorbent Assay*; ICI= ICI-118,551; IL= Interleukin; L= L-748,337

BRL wird als selektiver β3-Agonist vermarktet, zeigt jedoch eine vergleichsweise hohe Affinität zu β1- und β2-ADRs verglichen zu CL-316,243 (CL). CL hat eine höhere Spezifität für den β3-ADR-Subtyp (185,186). Die IL-6-Produktion wurde im Vergleich zur Kontrolle durch die höchste eingesetzte Konzentration (1 µM) von CL signifikant reduziert (p= 0,006, **Abb. 21 A**), durch gemeinsame Stimulation mit CL und ICI oder L hingegen nicht signifikant beeinflusst. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied beim Vergleich zwischen CL allein und zusammen mit ICI (10 nM) (CL 10 nM + ICI 10 nM: p= 0,03, CL 1 µM + ICI 10 nM; p= 0,003, **Abb. 21 B**).

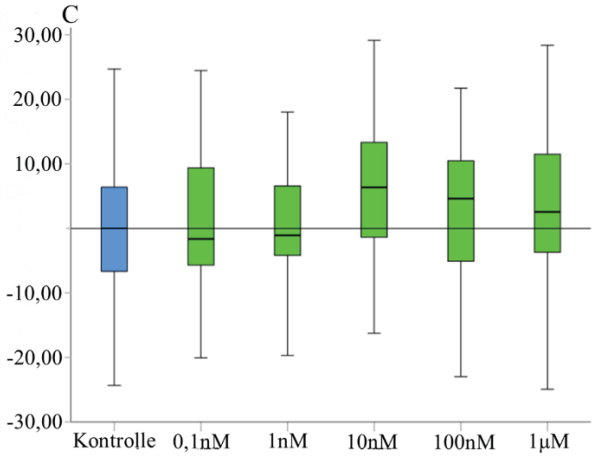
Für die IL-10-Produktion ergab sich verglichen zur Kontrolle in allein eingesetzten Konzentrationen kein Einfluss durch die alleinigen (**Abb. 21 C**) oder kombinierten Stimulationen mit CL (**Abb. 21 C**).

Die deskriptiven Statistiken zu den untersuchten Gruppen sind im Anhang in **Tabelle 52** (IL-6) und **Tabelle 53** (IL-10) dargestellt, die Ergebnisse der durchgeführten KW-Tests in **Tabelle 54** und die der paarweisen Gruppenvergleiche in **Tabelle 55** (IL-6) und **Tabelle 56** (IL-10).

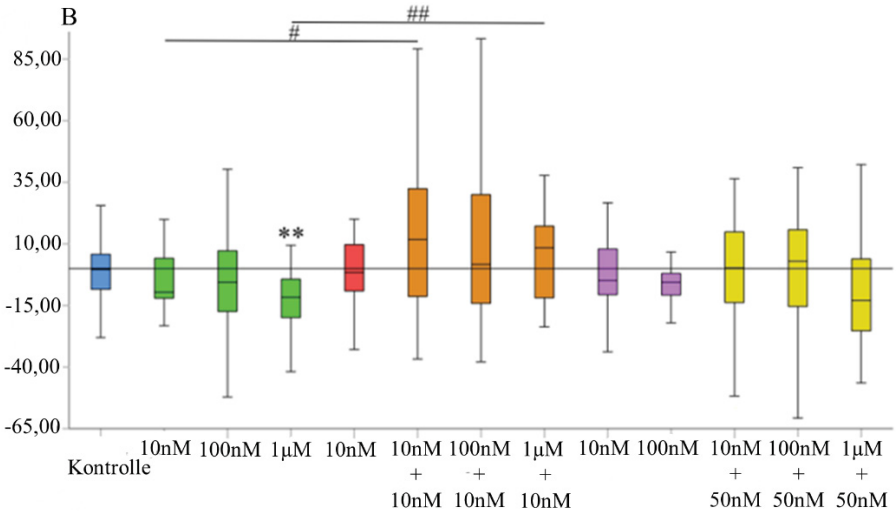
% IL-6 relativ zur Kontrolle



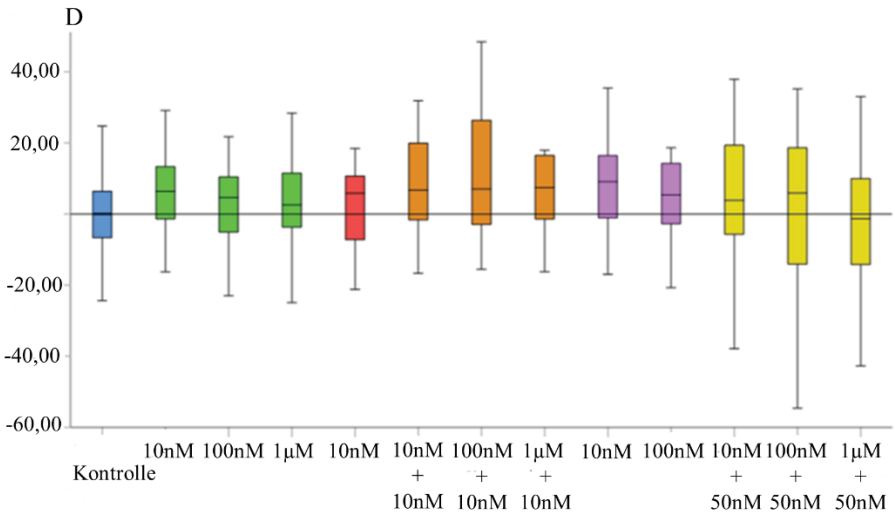
% IL-10 relativ zur Kontrolle



% IL-6 relativ zur Kontrolle



% IL-10 relativ zur Kontrolle



Kontrolle
CL-316,243 (*β*3-ADR-Agonist)
ICI-118,551 (*β*2-Antagonist)
L-748,337 (*β*3-Antagonist)
CL-316,243 + ICI-118,551
CL-316,243 + L-748,337

Abb. 21: Einfluss der *β*3-ADRs auf die IL-6-/ IL-10-Produktion humaner B-Zellen
A-D: IL-6- (**A,B**) und IL-10- (**C,D**) Produktion humaner B-Zellen über 48 h. B-Zellen wurden mit CpG aktiviert und zusätzlich mit CL (*β*3-Agonist) (**A,C**) und jeweils in Kombination mit ICI (*β*2-Antagonist) und L (*β*3-Antagonist) (**B,D**) stimuliert. Die Zytokinproduktion wurde mittels *ELISA* in den Überständen bestimmt. Alle Werte sind prozentual in Relation zur Kontrolle (nur CpG) dargestellt. Der Kruskal-Wallis-Tests mit Bonferroni-Korrektur wurde für alle Vergleiche (ADR-Stimulation *versus* Kontrolle und ADR-Stimulationen untereinander) angewendet. Das Signifikanzniveau betrug $p < 0,05$. *p= 0,05-0,01; **p= 0,01-0,001; ***p≤ 0,001 beim Vergleich zur Kontrolle. #p= 0,05-0,01; ##p= 0,01-0,001; ###p≤ 0,001 beim Vergleich der Stimulationsgruppen untereinander.
Kontrolle: n= 55; CL: 0,1 nM: n= 10; 1 nM: n= 10; 10 nM: n= 10; 100 nM: n= 10; 1 µM: n= 10; ICI: 10 nM: n= 10; L: 10 nM: n= 10; 100 nM: n= 10; CL + ICI: 10 nM + 10 nM: n= 9; 100 nM + 10 nM: n= 9; 1 µM + 10 nM: n= 9; CL + L: 10 nM + 50 nM: n= 9; 100 nM + 50 nM: n= 9; 1 µM + 50 nM: n= 9
ADR= Adrenerger Rezeptor; CL= CL-316,243; *ELISA= Enzyme-linked Immunosorbent Assay*; ICI= ICI-118,551; IL= Interleukin; L= L-748,337

3.2.4 Einfluss von Norepinephrin auf die IL-6-/ IL-10-Produktion

Zuletzt wurde auch die Interleukin-Produktion unter Einfluss des körpereigenen Katecholamins NE untersucht. NE wirkt in geringen Konzentrationen als α-ADR-Agonist, in höheren Konzentrationen zusätzlich als β-ADR-Agonist. Der Einsatz von NE zeigt keinen Effekt auf die IL-6-Produktion (**Abb. 22 A**).

Eine Stimulation mit NE (100 nM: p= 0,012; 1 µM: p≤ 0,001 und 10 µM: p≤ 0,001) führte hingegen zu einer Erhöhung der IL-10-Produktion durch CpG-stimulierte BZ (**Abb. 22 B**). Des Weiteren ergab sich eine verminderte IL-10-Konzentration bei Zugabe von 100 µM NE im Vergleich zu allen anderen verwendeten Konzentrationen (p≤ 0,001).

Die deskriptiven Statistiken zu den untersuchten Gruppen sind im Anhang in **Tabelle 57** (IL-6) und **Tabelle 58** (IL-10) dargestellt, die Ergebnisse der durchgeführten KW-Tests in **Tabelle 59** und die der paarweisen Gruppenvergleiche in **Tabelle 60** (IL-6) und **Tabelle 61** (IL-10).

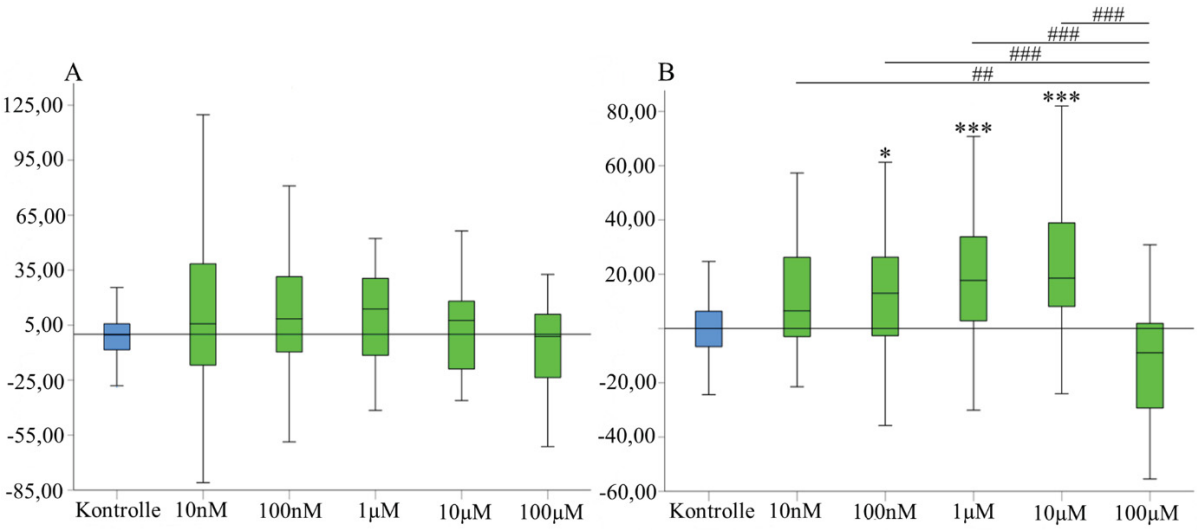


Abb. 22: Einfluss von Norepinephrin auf die IL-6-/ IL-10-Produktion humaner B-Zellen
A, B: IL-6 (**A**) und IL-10 (**B**) Produktion humaner BZ über 48 h. B-Zellen wurden mit CpG aktiviert und zusätzlich mit NE stimuliert. Die Zytokinproduktion wurde mittels *ELISA* in den Überständen bestimmt. Alle Werte sind prozentual in Relation zur Kontrolle (nur CpG) dargestellt. Der Kruskal-Wallis-Tests mit Bonferroni-Korrektur wurde für alle Vergleiche (ADR-Stimulation *versus* Kontrolle und ADR-Stimulationen untereinander) angewendet. Das Signifikanzniveau betrug p≤ 0,05. *p= 0,05-0,01; **p= 0,01-0,001; ***p≤ 0,001 beim Vergleich zur Kontrolle. #p= 0,05-0,01; ##p= 0,01-0,001; ###p≤ 0,001 beim Vergleich der Stimulationsgruppen untereinander.
Kontrolle: n= 55; NE: 10 nM: n= 14; 100 nM= 14; 1 µM: n= 14; 10 µM: n= 14; 100 µM: n= 14
ADR= Adrenerger Rezeptor; *ELISA= Enzyme-linked Immunosorbent Assay*; IL= Interleukin; NE= Norepinephrin

3.2.5 Einfluss von ADR-Liganden auf die TNF-*α*-Produktion

Nach 48-stündiger CpG-Stimulation der BZ gemeinsam mit Agonisten und Antagonisten der ADRs ergaben sich bei allen gemessenen Konditionen stets geringe TNF-Konzentrationen (Minimum: 0,12 pg/ml; Maximum: 78,82 pg/ml, Mittelwert: 21,09 pg/ml). Die Messung der TNF-*α*-Konzentrationen erfolgte als Kontrolle bei CpG stimulierten BZ und bei BZ nach zusätzlicher Stimulation mit Phen, Doxa, Dex, RS, Iso oder Nad. Die statistische Auswertung ergab für die Vergleiche der produzierten TNF-*α*-Konzentrationen der Kontrollgruppe und der Stimulationsbedingungen in verschiedenen Konzentrationen keine signifikanten Ergebnisse. Aus diesem Grund erfolgten keine weiteren *ELISA*s zur Detektion der TNF-*α*-Konzentrationen unter den andern in **Tabelle 8** aufgelisteten Stimulationskonditionen. Weiterhin lagen die meisten Messwerte unterhalb des Detektionslimits des *ELISA*, sodass eine Dateninterpretation nicht möglich war.

3.3 Nachweis essenzieller Proteine der Katecholamin-Aufnahme und des Abbaus in *CD*19+, humanen B-Zellen

In einem letzten Schritt sollte eruiert werden, ob eine auto- oder parakrin Wirkung durch eine eigene Katecholaminsynthese der Zellen möglich ist. Hierfür wurde die Expression der TH auf den Zellen mittel Western-Blot analysiert. Des Weiteren wurden die für die Katecholaminwiederaufnahme relevanten Transporter, sowie die Expression der katabolen Proteine MAO-A und MAO-B konkreter analysier.

3.3.1 Norepinephrin- und Dopamin-Transporter

Zunächst wurde die Expression des Norepinephrin-Transporters überprüft. Experimentell konnte eine spezifische Banden sowohl bei 65 kDa als auch bei 53 kDa beobachtet werden (**Abb**. **23 A**). Bei 65 kDa konnte eine spezifische Bande nur in der Positivkontrolle observiert werden, die Banden der BZ-Lysate wiesen eine sehr geringe Intensität bei diesem Molekulargewicht auf. Bei 53 kDa zeigten sich in allen eingesetzten Proben spezifische Banden. Die Detektion von Banden bei verschiedenen Molekulargewichten kann durch verschiedene NET-Formen bedingt sein, welche sich in der Glykosylierung des Proteins unterscheiden (187). Eine andere Erklärung könnte die endoproteolytische Spaltung der Proteine sein (188).

Eine spezifische Bande für den Dopamin-Transporter wurde nur in der Positivkontrolle bei 68 kDa nachgewiesen, jedoch zeigte sich diese in sehr schwacher Intensität (**Abb**. **24 A**). In den unstimulierten und stimulierten BZ konnten keine Banden beobachtet werden.

GAPDH ließ sich bei 37 kDa in allen Proben nachweisen (**Abb. 23 B** und **Abb. 24 B**).

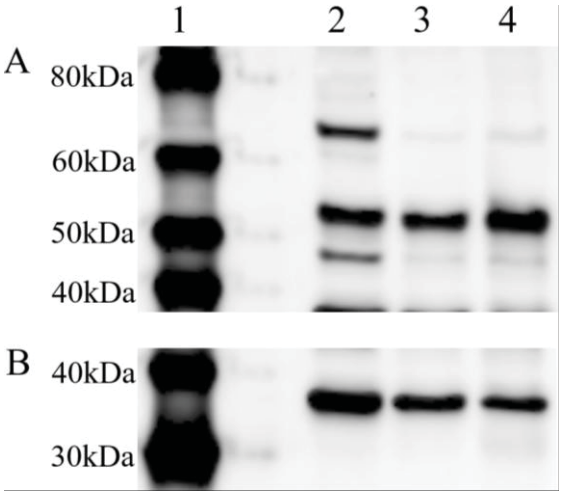


Abb. 23: Western Blot zum Nachweis des Norepinephrin-Transporters (NET)
A) Detektion des NET im Zelllysat aus humanem Hirntumorgewebe (Positivkontrolle, Spur 2) sowie Lysaten von naiven (Spur 3) und über 48 h CpG-stimulierten BZ (Spur 4). Spezifische Banden wurden bei 53 kDa und 65 kDa detektiert. **B)** GAPDH derselben Proben bei 37 kDa.
BZ= B-Zellen; GAPDH= Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; NET= Norepinephrin-Transporter

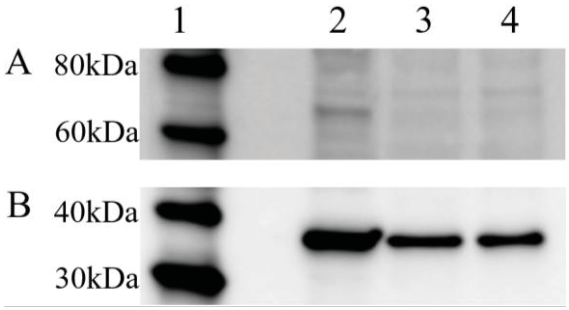


Abb. 24: Western Blot zum Nachweis des Dopamin-Transporter (DAT)
A) Detektion des DAT im Zelllysat aus humanem Hirntumorgewebe (Positivkontrolle, Spur 2) sowie Lysaten von naiven (Spur 3) und über 48 h CpG-stimulierten BZ (Spur 4). Spezifische Banden wurden nur in der Positivkontrolle bei 68 kDa detektiert. **B)** GAPDH derselben Proben bei 37 kDa.
BZ= B-Zellen; DAT= Dopamin-Transporter; GAPDH= Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

3.3.2 Monoaminooxidasen A und B

MAO-A wurde bei 60 kDa detektiert und konnte in der Positivkontrolle als auch in den BZ-Lysaten naiver BZ, nicht jedoch CpG-stimulierter BZ nachgewiesen werden (**Abb. 25 A**). Das höhere Molekulargewicht von MAO-A in BZ-Lysaten im Vergleich zur Positivkontrolle lässt auf unterschiedliche posttranslationale Modifikation schließen.

Die spezifischen Banden für MAO-B konnten in naiven und CpG-stimulierten BZ bei 60 kDa beobachtet werden (**Abb. 26 A**).

GAPDH ließ sich bei 36 kDa in allen Proben nachweisen (**Abb. 25 B** und **Abb. 26 B**).

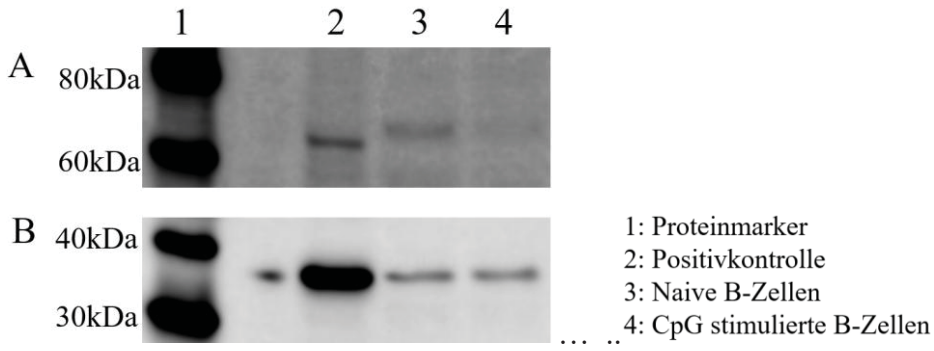


Abb. 25: Western Blot zum Nachweis der Monoaminooxidase A (MAO-A)
A) Detektion der MAO-A im Zelllysat aus humanem Hirntumorgewebe (Positivkontrolle, Spur 2) sowie Lysaten von naiven (Spur 3) und über 48 h CpG-stimulierten BZ (Spur 4). Spezifische Banden wurden in der Positivkontrolle und in naiven BZ bei 60 kDa detektiert. **B)** GAPDH derselben Proben bei 37 kDa.
BZ= B-Zellen; GAPDH= Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; MAO-A= Monoaminooxidase A

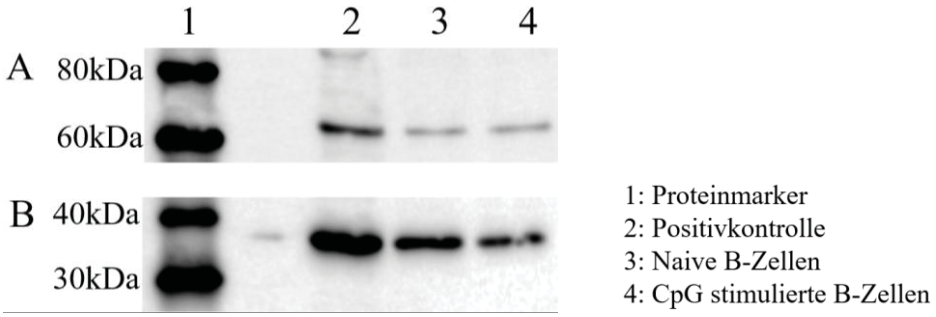


Abb. 26: Western Blot zum Nachweis der Monoaminooxidase B (MAO-B)
A) Detektion der MAO-B im Zelllysat aus humanem Hirntumorgewebe (Positivkontrolle, Spur 2) sowie Lysaten von naiven (Spur 3) und über 48 h CpG-stimulierten BZ (Spur 4). Spezifische Banden wurden bei 60 kDa detektiert.
B) GAPDH derselben Proben bei 37 kDa.
BZ= B-Zellen; GAPDH= Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; MAO-B= Monoaminooxidase B

3.3.3 TH und α1B-ADR

Ein Nachweis der TH und des α1B-ADR auf humanen BZ war mit den verwendeten Antikörpern und der angewendeten Western-Blot-Methode nicht möglich, da sich auf dem gesamten Blot viele unspezifische Banden darstellten und sich auch in den Positivkontrollen keine eindeutigen Banden präsentierten.

4 Diskussion

4.1 Adrenerge Rezeptoren und deren immunmodulatorischen Eigenschaften

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des adrenergen Einflusses auf die immunmodulatorische Funktion humaner BZ. Um ein besseres Verständnis dieser Prozesse zu erlangen, wurde die Expression adrenerger Rezeptoren auf humanen, peripheren *CD*19+ BZ gesunder Erwachsener analysiert. Diese Rezeptoren bilden die Grundlage für eine neuroimmunmodulatorische Wechselwirkung (49,126,148). Adrenerge Rezeptoren konnten bereits auf humanen und murinen Immunzellen nachgewiesen werden. Zudem ist bekannt, dass deren Expression durch den Aktivierungszustand der Zelle sowie durch Zytokine oder Neurotransmitter moduliert werden kann (14,98,107,126).

In den vorliegenden Untersuchungen konnte die Expression der Rezeptorsubtypen α1A, α2B, β1, β2 und β3 nachgewiesen werden. Um die immunmodulatorische Funktion dieser Rezeptoren zu charakterisieren, wurde die Produktion pro- und antiinflammatorischer Zytokine untersucht.

Der α1A-Rezeptor wurde sowohl intrazellulär als auch auf der Plasmamembran der BZ exprimiert. Eine CpG-Stimulation führte zu einer signifikanten Erhöhung der Rezeptordichte an der Zelloberfläche. Der adrenerge α1B-ADR konnte hingegen nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stimmen teilweise mit Daten aus murinen BZ überein, bei denen nach Zellstimulation eine verstärkte Expression von α1A- und α1B-ADRs beobachtet wurde. Diese Befunde deuten darauf hin, dass eine Bindung von Katecholaminen an diese Rezeptoren in BZ möglicherweise Signaltransduktionsprozesse auslösen könnten (14). Die Expression von α1-ADRs auf humanen *PBMC*s wurde bereits beschrieben. Eine spezifische Expression auf humanen BZ wurde bislang jedoch nicht untersucht (133–135).

Da bekannt ist, dass eine Aktivierung des α1-ADR über die G_q-Proteinkopplung zu einer Aktivierung der PKC sowie zu einem Einstrom von Calciumionen führt, könnte die dadurch induzierte Proteinphosphorylierung intrazelluläre Prozesse beeinflussen (109).

In weiterführenden *ELISA*-Studien konnten wir durch spezifische Stimulation des α1-ADR mit Agonisten und Antagonisten feststellen, dass die Aktivierung des α1-ADR mittels Phenylephrine, einem α1-ADR-Agonist, zu einer erhöhten Ausschüttung von IL-10 führte, während die IL-6-Produktion unbeeinflusst blieb. Eine Ligation des Rezeptors mit dem α1-ADR-Antagonisten Doxazosin hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Sekretion von IL-6 und IL-10. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Beobachtungen an murinen BZ, bei denen

eine Stimulation des α1-ADR mit einer signifikanten Reduktion der IL-10-Produktion einherging (14). In einer Studie mit humanen Leukozyten konnte nach Stimulation mit LPS und Phen eine signifikante Erhöhung der IL-10-Sekretion nachgewiesen werden, was unsere Befunde in einem humanen System weiter unterstützt (189).
In einem weiteren Schritt unserer Untersuchungen wurde eine simultane Stimulation mit Phen und Doxa durchgeführt. Doxa fungiert als kompetitiver Antagonist und kann einen Teil der Rezeptoren blockieren. Da Phen in höheren Konzentrationen verabreicht wurde, war es in der Lage Doxa, welches eine höhere Rezeptoraffinität als Phen aufweist, teilweise vom Rezeptor zu verdrängen, wodurch die IL-10-induzierte Wirkung zunächst erhalten blieb. Bei einer weiteren Steigerung der Phen-Konzentration konnte jedoch kein signifikanter Effekt mehr auf die IL-10-Produktion festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte auf eine Desensibilisierung des α1-ADR zurückzuführen sein. Als G_q-gekoppelter Rezeptor kann der α1A-ADR bei starker Aktivierung durch PKC-vermittelte Phosphorylierung verändert werden, was zu einer erhöhten Affinität für β-Arrestin und in der Folge zu einer Rezeptorinternalisierung führt (174,190,191).
Zusammengefasst deuten die Ergebnisse darauf hin, dass extrazelluläre Katecholamine durch Stimulation des α1A-ADR in humanen BZ eine antiinflammatorische Wirkung vermitteln könnten. Diese Effekte könnten durch Stimulation der Zellen durch vermehrte Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche verstärkt werden.

Der α2A-Rezeptorsubtyp konnte in unseren humanen Studien auf den untersuchten BZ nicht nachgewiesen werden. Der α2B-ADR hingegen konnte auf der Plasmamembran dargestellt werden. Nach CpG-Stimulation zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Rezeptorexpression. Dies steht im Konsens mit den Ergebnissen an murinen B-Zellen, auch hier konnte der α2B-ADR und eine signifikante Steigerung der Expression nach Stimulation nachgewiesen werden (14).
Die Antagonisierung der α2-ADRs mittels RS-79948 zeigte eine signifikante Verminderung der IL-6-Konzentration. α2-ADRs sind G_i-Protein-gekoppelt, senken die intrazelluläre cAMP-Konzentration und gehen mit einer Aktivierung proinflammatorischer Signalwege einher. Eine Antagonisierung der Rezeptoren mit RS führt demnach zu einer erhöhten cAMP-Konzentration und einer Förderung antiinflammatorischer Prozesses, in diesem Fall zu einer Senkung der IL-6-Konzentration (62,114). Diese Beobachtungen konnten ebenfalls an murinen BZ, auch im Rahmen von Arthritismodellen, festgestellt werden (132).
Eine agonistische Modulation des α2-ADR mit Dexmedetomidine zeigte hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die IL-6-Produktion. Dies könnte dadurch begründet werden, dass

GPCRs ligandenabhängig unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden initiieren können (192). So könnte es sein, dass Dex keinen Einfluss auf die Transkriptionsfaktoren von IL-6 ausübt. In anderen Studien wurde die Vermutung aufgestellt, dass Dex über andere Signalwege in verschieden Zellpopulationen die IL-6-Produktion inhibiert. Daran scheinen die CpG-induzierten Signalwege beteiligt zu sein. Über den TLR-9 wird *MyD88* aktiviert und Signalkaskaden über den *NF-κB* oder die in BZ dominierenden Interferon-regulatorischen Faktoren (IFR), vor allem IFR5 und IRF7, initiiert. Die IL-6-Produktion in BZ wird insbesondere über die IFR-Signalkaskade moduliert. Dexa hat insgesamt wenig Effekt auf die durch IRF-bedingte Produktion von IL-6. In anderen Zellen ist insbesondere die *NF-κB*-Inhibition für die verminderte IL-6-Produktion relevant. (193–196).
Eine Stimulation der BZ mittels RS zeigte einen signifikanten Anstieg der IL-10-Produktion, was im Konsens mit den Ergebnissen an murinen B-Zell-Studien steht (14). Dies könnte begründet werden durch die erhöhte cAMP-Konzentration und der einhergehenden *CREB*-Signalkaskade, welche eine Steigerung der IL-10-Konzentration bedingt (110,114,197). Untersuchungen an murinen B-Zellen zeigten bei der Inkubation mit Dex einen signifikanten Abfall der IL-10-Produktion (14). In unseren Untersuchungen hingegen kam es durch eine Stimulation mit 100 nM Dex zu einer Steigerung der IL-10-Konzentration. Dies könnte darauf hindeuten, dass intrazellulär verschiedene Signalkaskaden aktiviert werden könnten, welche beispielsweise über p38, MAPK oder *ERK*1/2 die IL-10-Stimualtion anregen könnten (16,174). Der Einsatz von 1 µM Dex hingegen zeigte keinen weiteren Einfluss auf die IL-10-Produktion, dies könnte wie oben bereits beschrieben mit der Desensibilisierung und Internalisierung der Rezeptoren einhergehen (191). Des Weiteren könnte eine hohe eingesetzte Dex-Konzentration zu weiteren unspezifischen Effekten über weitere Rezeptoren führen und somit die IL-10-Steigerung vermindern (198).
Zusammengefasst könnten diese Ergebnisse darauf hindeuten, dass über die Modulation der α2-ADRs antiinflammatorische Signalkaskaden, am ehesten über die G_i-Protein-gekoppelten Signaltransduktionsmechanismen, in humanen BZ vermittelt werden könnten.

Zuletzt wurde eine genaue Untersuchung an den β-ADR-Subtypen durchgeführt. Im intrazellulären Kompartiment konnte die Expression des β1-ADR nachweisen werden. Eine CpG-Stimulation zeigte keine Modulation der Rezeptorexpression. Konkrete Studien zur Expression dieses Subtyps sind sowohl zu humanen oder murinen B-Zellen in der Literatur nicht vorliegend. In Untersuchungen an humanen Lymphozyten war der Nachweis aller drei β-ADR-Subtypen sowohl auf mRNA-, als auch Proteinebene möglich (199).

Die adrenergen Rezeptorsubtypen *β*2 und *β*3 konnten in den durchflusszytometrischen Untersuchungen sowohl auf der Plasmamembran als auch im intrazellulären Kompartiment nachgewiesen werden. Es stellte sich ein CpG-bedingter Anstieg der *β*3-ADR-Expression auf der Plasmamembran dar. Auch zur spezifischen Expression des *β*3-ADR-Subtyps auf humanen oder murinen B-Zellen existieren bisher keine Daten. In der Literatur wird die Expression des *β*2-ADR sowohl auf murinen als auf humanen BZ vorbeschrieben (14,164,200–203). Dieser stellt den dominierender Subtyp auf den meisten Immunzellen dar (93).

Bei Isoproterenol handelt es sich um einen *β-ADR*-Liganden mit einer geringen Affinität und Selektivität für einen bestimmten Rezeptorsubtyp (204). Eine Stimulation der BZ mit Iso zeigte eine konzentrationsabhängige, signifikante Steigerung der IL-10-Produktion. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Untersuchungen an murinen B-Zellen (14). Dies deutet darauf hin, dass eine *β*-ADR-vermittelte BZ-Stimulation antiinflammatorische Prozesse initiieren könnten. Dies könnte durch die G_s-Kopplung, die Adenylatcyclase, sowie die cAMP- und PKA-vermittelten Signalwege initiiert werden, welche *CREB* und Transkriptionsfaktoren für die IL-10-Produktion rekrutieren (110,114).

Nadolol ist ein unspezifischer Ligand, welcher an *β*-ADRs als Antagonist fungiert (204). Auch unter der Stimulation mit Nadolol kam es zu einem signifikanten Anstieg der IL-10-Konzentration. Eine gemeinsame Inkubation mit Iso und Nad hebt die Effekte auf. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen an murinen BZ. Hier kam es nach Stimulation mit Nadolol zu keiner signifikanten Veränderung der IL-10-Produktion vergleichen mit der Kontrollgruppe (14).

Die signifikante Steigerung der IL-10-Produktion nach Stimulation durch Nad und die gegensätzlichen Befunde an murinen BZ könnten auf einen paradoxen Nad-Effekt hinweisen, demnach auf eine partielle oder invers agonistische Wirkung. Des Weiteren könnten eine Disinhibition einer tonischen *β*-ADR-Aktivität oder auch alternativ aktivierte Signalwege mögliche Erklärungen sein (204–207). Es besteht die Möglichkeit, dass nicht klassischerweise die cAMP-Achse aktiviert wird. Es könnte beispielsweise sein, dass über *β*2-ADR *β*-Arrestin oder MAPK aktiviert werden und über deren weiterführenden Signalkaskaden IL-10 produziert wird (207–209). Da Nad als kompetitiver Antagonist an *β*-ADRs wirkt, könnten in gemeinsamer Stimulation mit Iso die antagonistischen Eigenschaften dominieren. Iso könnte demnach nicht mehr effektiv an den Rezeptoren binden und blockiert somit die weitere IL-10-Produktion. Die gegensätzlichen Ergebnisse zur den murinen Experimenten könnten möglicherweise durch unterschiedliche Ligandenaffinität oder verschiedene induzierte Signalwege in humanen und murinen Zellen begründet werden (204,207).

In weitergehenden Untersuchungen erfolgte die Stimulation der BZ mit dem spezifischen *β*2-ADR-Anatagonisten ICI-118,551 und dem spezifischen *β*3-ADR-Antagnoisten L-748,337 (210,211). Die Stimulation jeweils mit diesen Antagonisten zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die IL-10-Produktion. Dies könnte ebenfalls ein Hinweis auf die inverse Wirkung oder die Induktion anderer Signalkaskaden durch Nadolol sein. ICI und L könnten hier als klassische Antagonisten ihre Wirkung erfüllen und blockieren über die verminderte cAMP-Produktion die IL-10-Ausschüttung. In murinen Studien zeigte sich durch ICI-Antagonisierung eine signifikante Reduktion der IL-10-Produktion (14).

Eine gemeinsame Stimulation mit dem unspezifischen *β*-ADR-Agonisten Iso und dem *β*3-ADR-Antagnoisten L zeigt keinen signifikanten Effekt mehr auf die IL-10-Produktion, während weiterhin ein signifikanter Anstieg der IL-10-Produktion durch die gemeinsame Stimulation mit Iso und dem *β*2-ADR-Anatagonisten ICI gemessen werden konnte. Die unspezifische Wirkung von Iso an den *β*-ADRs kann durch die Antagonisierung des *β*3-ADR-Subtyps mittels L aufgehoben werden. Dies könnte unter anderem damit begründet werden, dass in unseren Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie der *β*3-ADR-Subtyp auf den humanen *CD*19+ BZ am stärksten exprimiert wurde und nur in dieser Subgruppe eine CpG-bedingte vermehrte Expression nachgewiesen werden konnte. In Studien an humanen Lymphozyten war hingegen der *β*2-ADR der dominante Subtyp (199). Eine Antagonisierung des *β*2-ADR-Subtyps mittels ICI konnte den Effekt von Iso hingegen nicht inhibieren.

Andererseits wäre eine weitere Hypothese, dass die initiierten Signaltransduktionsprozesse über den *β*3-ADR-Subtyp die maßgeblichen für die IL-10-Produktion sind. Dies könnte erklären, dass die Isoproterenol-induzierte IL-10-Produktion trotz Inhibierung der *β*2-ADRs durch ICI weiterhin signifikant gesteigert wurde und durch die L-bedingte *β*3-Antagonisierung keine signifikante IL-10-Produktion mehr gemessen werden konnte. Auch in murinen Studien konnte ein signifikanter IL-10-Anstieg durch die Stimulation des *β*3-ADR mit CL nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich widersprüchlich zu den Ergebnissen in dieser Arbeit ein signifikanter Abfall der IL-10-Produktion in den murinen Studien durch *β*2-Antagonisierung mit ICI (14).

Dass die *β*3-ADR-Stimulation maßgeblich für die IL-10-Produktion verantwortlich ist, steht jedoch teilweise im Widerspruch zu den Ergebnissen der weiterführenden Untersuchungen, in welchen die beiden *β*3-ADR-Agonisten BRL und CL eingesetzt wurden. CL hat verglichen zu BRL eine höhere Spezifität für den *β*3-ADR-Subtyp, während BRL weiterhin eine geringe Affinität für die *β*1- und *β*2-ADR-Subtypen aufweist (185,186). Eine Stimulation der BZ nur mit CL zeigte keinen Einfluss auf die IL-10-Produktion, auch nicht in Kombination mit einer

Antagonisierung der β2- und β3-ADR-Subtypen durch Kostimulation mit ICI oder L. Die Stimulationen in verschiedenen Konzentrationen mit BRL zeigten nur in der höchsten eingesetzten Konzentration von 1 µM eine signifikante IL-10-Steigerung. Dies könnte durch die geringere Selektivität von BRL vergleichen zu CL und die zusätzliche Bindung an die β1- und β2-ADR-Subtypen bedingt sein. Eine simultane Stimulation von BRL und dem β3-ADR-Antagonisten L zeigte keinen Einfluss auf die IL-10-Produktion. Eine simultane Stimulation mit BRL und dem β2-ADR-Antagonsiten ICI zeigte hingegen eine signifikante Steigerung der IL-10-Produktion, obwohl beide Liganden jeweils allein die IL-10-Produktion nicht beeinflussten. Die genauen intrazellulären Prozesse, die diese Ergebnisse erklären sind unklar und bedürfen weiterführenden Untersuchungen, unter anderem die Bestimmung der aktivierten Kinasen und Transkriptionsfaktoren. Es könnte sein, dass durch die Stimulation die ADRs sekundäre Signalwege aktivieren, die die IL-10-Produkton initiieren könnten (207).
Die unterschiedlichen Ergebnisse der IL-10-Produktion durch β3-ADR-CL-Stimulation bei den vorliegenden humanen und murinen Studien in der Literatur, in welchen ein signifikanter IL-10-Anstieg durch CL-Stimulation beschrieben wurde, könnte durch unterschiedliche speziesbedinge Ligandenaffinität und Effektivität begründet sein (204,207).
Für zukünftige Studien sollte die spezifische Anwendung von β1- und β2-ADR-Agonisten in den Fokus gerückt werden, um direkte stimulierende Effekte dieser Liganden auf die ADRs-Subtypen und deren Einfluss auf die immunmodulatorische Funktion auf humanen BZ einschätzen zu können.
Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die antiinflammatorische Wirkung der BZ durch die IL-10-Produktion über die β-ADRs moduliert werden können. Insgesamt scheint der β2-ADR-Subtyp, wie bereits in der Literatur zuvor beschrieben der hierfür dominante Subtyp zu sein. Des Weiteren könnten auch β1- und β3-vermittelte Signalproesse immunmodulatorisch Wirken, da alle drei Subtypen auf humanen BZ exprimiert werden. Insbesondere zeigte sich eine signifikant vermehrte Expression des β3-Subtyps nach CpG-Stimulation verglichen zur Kontrollgruppe. Hier könnte in zukünftigen Studien angeknüpft werden.

Neben den antiinflammatorischen Effekten durch die IL-10-Produktion wurde auch die Modulation der proinflammatorischen Effekte anhand der IL-6-Produktion untersucht. Die Stimulationen mit Isoproterenol und Nadolol zeigten insgesamt keinen Einfluss auf die IL-6-Produktion. Auch die spezifische Antagonisierung der β2- und β3-ADR-Subtypen mittels ICI und L zeigten keinen Einfluss auf die IL-6-Produktion, lediglich in der höchsten eingesetzten L-Konzentration 1 µM (β3-ADR-Antagonist) zeigte sich ein signifikanter Abfall

der IL-6-Konzentration. Dies könnte bei hoch eingesetzten ADR-Liganden-Konzentrationen mit einer Desensibilisierung und Internalisierung der Rezeptoren bedingt sein oder durch weitere Effekte oder anderweitige Rezeptoraktivierungen zu einer verminderten IL-6-Produktion beitragen (191,198).

Auch für die Untersuchungen der IL-6-Produktionen wurden kombinierte Stimulationskonditionen eingesetzt. Sowohl die Stimulation mit Iso (β3-ADR-Agonist) und ICI (β2-ADR-Antagonist), als auch von Iso und L (β3-ADR-Antagonist) zeigten einen signifikanten IL-6-Anstieg, obwohl die Stimulanzien allein keinen Einfluss auf die IL-6-Produktion hatten. Isoproterenol könnte über die klassische Gs-gekoppelte β-ADR-Signalkaskade über cAMP und PKA die antiinflammatorischen Effekte, unter anderem über die Hemmung des Transkriptionsfaktors *NF-κB*, die IL-6-Produktion verhindern. Wird mittels ICI oder L jeweils der β2- oder β3-ADR-Subtyp antagonisiert scheint eine Rezeptormodulation stattzufinden, die proinflammatorische Pfade, beispielsweise über β-Arrestin und MAPK aktivieren und durch die Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren damit die IL-6-Produktion stimulieren könnten. Es könnte auch durch die vermehrte Rezeptormodulation über die Phosphorylierung durch die PKA ein Wechsel der G_s-Kopplung zu einer erhöhten Affinität zu G_i stattgefunden haben, was erklären würde, dass die Stimulanzien allein keinen Effekt zeigten (98,151,212–214).

Die Inkubation der Zellen mit BRL oder CL, jeweils β3-ADR-Agonisten mit unterschiedlicher Affinität, zeigte keinen Einfluss auf die IL-6-Produktion. Wurden kombinierte Stimulationen mit dem β3-ADR-Agonisten BRL und dem β2-ADR-Antagonisten ICI sowie mit BRL und dem β3-ADR-Antagonisten L angewendet, kam es im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit BRL, jedoch nicht im Vergleich zur Kontrollgruppe, zu einem signifikanten Anstieg der IL-6-Produktion. Dies zeigte sich ebenfalls in der kombinierten Stimulation mit dem spezifischerem β3-*ADR*-Agonisten CL und ICI (β2-ADR-Antagonisten) im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit CL, jedoch nicht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Beobachtungen konnten nicht für die gemeinsame Stimulation aus CL und L (β3-ADR-Antagonisten) dargestellt werden.

Insgesamt lässt sich darstellen, dass durch spezifische β-ADR-Ligation auch proinflammatorische Prozesse, wie die IL-6-Produktion induziert werden können.

In einem letzten Schritt erfolgte die Stimulation der BZ mit Norepinephrin. Norepinephrin ist ein endogenes Katecholamin, welches als Agonist an die jeweils bereits beschriebenen Rezeptoren binden kann, es zeigt jedoch eine unterschiedliche Affinität für die Rezeptoren. Die IL-10-Produktion konnte konzentrationsabhängig signifikant gesteigert werden. Dies konnte

bereits in murinen BZ-Studien nachgewiesen werden (14,41). Bei geringer NE-Konzentration bindet NE vermehrt an *α*-ADRs aufgrund der geringeren Affinität an *β*-ADRs (91,132,142,154–156). Mit steigender NE-Konzentration bindet NE vermehrt auch an *β*-ADRs. Die Steigerung der IL-10-Produktion könnte am ehesten auf die G*s*-gekoppelten Signalkaskaden durch die *β*-ADR-Stimulation zurückzuführen sein. Durch die Aktivierung der Adenylatcyclase steigt die cAMP-Konzentration und damit die Aktivierung der PKA (110,114). Durch die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wird die IL-10-Produktion angeregt. In der Literatur ist beschrieben, dass NE eine bis zu 10-fach höhere Affinität für humane *β*1-ADR-Subtypen verglichen zum *β*2-ADR-Subtyp hat. Diese Untersuchungen fanden insbesondere in einem kardiovaskulärem Kontext statt (215). Ob diese Daten auf die Affinität der *β*-ADRs auf BZ übertragbar sind, ist unklar und Bedarf weiterer Untersuchungen.
In der höchsten einsetzten Konzentration 100µM, konnte ein Abfall der IL-10-Produkton nachgewiesen werden. Die könnte einhergehen mit einer Rezeptordesensibilisierung oder einer Zelltoxizität bei erhöhter Konzentration (132,216).
Auf die IL-6-Produktion zeigte die Stimulation der Zellen mit NE keinen Einfluss. Prinzipiell wäre es denkbar, dass NE über seine Bindung an *α*-ADRs proinflammatorische Signalwege initiieren kann. In der Literatur wurde beschrieben, dass hohe NE-Konzentrationen (100 µmol/L) sowohl *α*- als auch *β*-ADRs aktivieren, Konzentrationen unter diesem Schwellenwert stimulieren vornehmlich *α*-ADRs (132). In unseren Studien konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die *β*-ADRs auf den BZ dominanter sind. Gleichzeitig könnte über die *β*-ADR-vermittelte cAMP-Produktion die Transkription von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-6, über *NF-κB* gehemmt werden, was erklären könnte, wieso konzentrationsunabhängig kein Effekt auf die IL-6-Produktion dargestellt werden könnte (151,212,214,217).
Insgesamt passen diese Ergebnisse zu der in der Literatur beschriebenen, entzündungshemmen Wirkung von NE, welche insbesondere über *β*-ADRs vermittelt wird (16,41,217).

In einem letzten Schritt sollte auch die TNF-*α*-Produktion unter denselben Stimulationsbedingungen untersucht werden. Eine messbare Messung von TNF-*α*-Konzentrationen war jedoch nicht möglich. Dies könnte durch die Inkubationszeit von 48 Stunden bedingt sein. In der Literatur wurde beschrieben, dass die maximale Konzentration an TNF-*α* in den Überständen nach Kultivierung der BZ zwischen 6 und 24 Stunden nachgewiesen werden konnten. Eine Stimulation darüber hinaus erbrachte, dass die Konzentration in den Überständen wieder abfiel, was für einen frühzeitigen Abbau von TNF-*α* spricht (218). Um dies weiter nachvollziehen zu können sind weitere Untersuchungen mit

verkürzten Stimulationsdauern notwendig. Generell konnte in der Literatur bereits dargestellt werden, dass BZ in der Lage sind TNF-α zu exprimieren (16). Über die Beeinflussung der Expression durch adrenerge Modulation ist zum aktuellen Zeitpunkt keine Aussage möglich.

4.2 Proteine des Katecholaminmetabolismus in B-Zellen

Ein weiteres Ziel der Studie war die Untersuchung der Expression essenzieller Proteine der Katecholamin-Synthese und des -Metabolismus in humanen BZ sowie die Bewertung des Effekts einer TLR-9-Aktivierung. Der Fokus lag auf der TH, den Transportern für Norepinephrin und Dopamin sowie den katecholaminabbauenden Enzymen Monoaminooxidase MAO-A und MAO-B.

In unseren Studien konnte mittels Western-Blot an BZ eines Probanden NET sowohl in naiven als auch CpG-stimulierten BZ nachgewiesen werden. DAT und TH waren nicht detektierbar. MAO-A wurde ausschließlich in naiven BZ, nicht jedoch CpG-stimulierten BZ detektiert, wohingegen MAO-B in naiven und CpG-stimulierten BZ nachgewiesen werden konnte.

Während in der Literatur die Katecholaminsynthese, einschließlich der TH-Expression in humanen *PBMCs* und murinen TZ und BZ beschrieben ist, fehlen spezifische Daten zu humanen BZ (14,94,104,107,123,136–140). Generell ergibt sich jedoch die Hypothese, dass Immunzellen auto- und parakrin die Immunantwort katecholaminabhängig modulieren könnten (107,124). In murinen Lymphozyten aus der Milz wurde durch TLR-9-Stimulation mittels CpG ein signifikanter Anstieg der TH-Expression festgestellt (14,137).

In unserer Studie war TH nicht nachweisbar. Aufgrund der Stichprobengröße von n=1 sind jedoch keine belastbaren Interpretationen bezüglich der TH-Expression in humanen BZ gesunder Probenden möglich. Es bedarf einer größeren Stichprobe.

Die unterschiedlichen Ergebnisse auf murinen und humanen BZ könnten auf differente epigenetischer und transkriptionelle Mechanismen zurückzuführen sein (219).

In unserer Studie wurden lediglich B-Zellen gesunder Probanden angewendet. Unter pathologischen Bedingungen oder spezifischer Stimulation könnte eine TH-Expression denkbar sein und sollte näher untersucht werden. Beispielweise konnte bei RA-Patienten in Immunfluoreszenz-Analysen gezeigt werden, dass CD-19+ BZ sich in lokal entzündetem Gewebe positiv für TH färbten, während dies in Blutproben nicht nachgewiesen werden konnte (142). In murinen Studien zeigte sich im Verlauf der CIA eine zunehmende TH-Expression, die mit einer erhöhten IL-10-Produktion einherging. Insbesondere eine TLR-Stimulation beeinflusste die TH-Expression in BZ signifikant, was die Differenzierung zu B_{REG} begünstigen könnte (14,168).

In murinen B-Zellen und humanen *PBMCs* konnte der NET bereits nachgewiesen werden (14,107). Auch in unserer Studie konnte NET bei einem Probenden in naiven und CpG-stimulierten BZ detektiert werden. Quantitative Aussagen über Expression zwischen den naiven und CpG-stimulierten BZ sind bei n=1 nicht möglich, bilden jedoch eine Grundlage für weitere Untersuchungen. Die Ergebnisse könnten darauf hindeuteten, dass humane B-Zellen in der Lage sind, Katecholamine intrazellulär aufzunehmen und deren Wirkung an adrenergen Rezeptoren zu modulieren. Von Interesse wäre ebenfalls, ob sich die Expression dieser Transporter während entzündlichen Prozesses oder chronischer Entzündungen, wie RA, verändert. Bislang liegen hierzu keine Untersuchungen vor. Eine verminderte Wiederaufnahme könnte zu einer erhöhten NE-Konzentration führen, die durch die höhere Bindungsaffinität an α-ADRs im Vergleich zu β-ADRs zu einer verstärkten β-ADR-Aktivität und einer erhöhte intrazellulären cAMP-Konzentration führen könnte. Dies könnte antientzündliche Prozesse, wie eine gesteigerte IL-10-Produktion fördern und wäre potenziell für therapeutische Ansätze von Interesse.

Neben den Transportern konnten in humanen *PBMCs* auch die katabolen MAOs nachgewiesen werden (103,106,143). Untersuchungen an Lymphozyten zeigten eine vermehrte Expression der Isoform MAO-B (104,144,186,187). In unserer Studie konnte MAO-A und MAO-B nachgewiesen werden. In vorausgegangenen Studien am CIA-Maus-Modell konnte eine Hochregulation der MAO-B dargestellt werden. Um die Bedeutung der Expression zu untersuchen, wurden Modulationen der Monoaminooxidase B vorgenommen, dies führte im Kontext der rheumatischen Erkrankung zu einer Verbesserung des klinischen Geschehens und einer verminderten Entzündungsinfiltration im Maus-Modell (220,221).

Auch bei Patienten mit RA wären weitere Untersuchungen zur Expression von MAO auf BZ von Interesse. Auch weitere Zelltypen wie Fibroblasten oder Makrophagen könnten für die Produktion von MAO insbesondere in entzündetem Gewebe relevant sein. Ein verminderter Norepinephrinabbau könnte, wie oben beschrieben, antiinflammatorische Effekte verstärkten.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde der Western-Blot lediglich an einer einzelnen humanen Probe durchgeführt. Dies stelle eine wesentliche Limitation dar, da aussagekräftige quantitative oder statistische Auswertungen nicht möglich sind. Für generalisierbare und reproduzierbare Aussagen zur Expression der Zielproteine sind insgesamt weitere Studien mit einer größeren Probandenzahl erforderlich.

Es gibt Hinweise darauf, dass die Immunmodulation nicht ausschließlich über die klassischen *GPCR*-vermittelten Signalwege erfolgt. Um fundierte Aussagen über die immunmodulatorische Funktion humaner BZ treffen zu können, sollten daher auch alternative

Signaltransduktionswege berücksichtigt werden, insbesondere die Aktivierung der Kinasen *β*-Arrestin, MAPK, wie p38 und *ERK* sowie der damit verknüpften Transkriptionsfaktoren wie *CREB* und *NF-κB* (16,132,151,174).

In murinen Studien wurde gezeigt, dass es in der Spätphase des chronischen Stadiums der Arthritis zu einer zunehmenden Verschiebung der *β*2-ADR-Signaltransduktion kommt. Dabei verschiebt sich die Signalweiterleitung von der klassischen cAMP-PKA-Achse hin zu einer *β*-Arrestin-vermittelten Signalkaskade, welche mit der Aktivierung von MAPK-Kaskaden, wie *ERK*, p38 assoziiert ist. Diese Verschiebung bewirkt über PKA-abhängige Mechanismen die Modulation der Rekrutierung und Funktion von *β*-Arrestin. Aktivierte MAPKs phosphorylieren nachgeschaltete Transkriptionsfaktoren, die die Expression immunrelevanter Gene modulieren. Insgesamt zeigte sich in diesen Untersuchungen eine Assoziation zwischen der Aktivierung dieser Signalwege und einer erhöhten IL-10-Produktion. In der Frühphase der Arthritis hingegen wurde eine Reduktion dieser sekundären Botenstoffe beobachtet (41,151,153,174,222).

Während der CIA konnte eine Zunahme der *β*2-ADR-exprimierenden BZ festgestellt werden, ohne dass sich die Rezeptordichte veränderte. Diese Befunde deuten darauf hin, dass IL-10-fördernde Signalwege im Stadium etablierter Arthritis verstärkt über *β*2-ADR-abhängige Mechanismen vermittelt werden. Die dynamische Veränderung der *β*2-ADR-Expression und der Signalübertragung während der persistierenden Entzündung könnte somit einen wesentlichen Beitrag zur Verschiebung von pro- hin zu antiinflammatorischen sympathischen Effekten in der späten Arthritis leisten.

β-Arrestin vermittelt dabei sowohl die Desensibilisierung des Rezeptors als auch dessen Endozytose und trägt somit zur Beendigung des klassischen *GPCR*-Signalübertragung bei (41,151,153,174).

5 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich annehmen, dass BZ unter adrenergem Einfluss immunmodulatorische Funktionen ausüben und aktiv am Katecholaminmetabolismus beteiligt sind. Autokrine und parakrine Effekte von Katecholaminen auf BZ selbst, sowie auf andere Immunzellen erscheinen, wie bereits in der Literatur für murine Zellen beschrieben, möglich (174).

Grundlage für diese Funktionalität ist die Expression von ADRs. In unseren Untersuchungen konnten die Rezeptorsubtypen *α*1A, *α*2B, *β*1, *β*2 und *β*3 nachgewiesen werden. Zudem ergaben sich Hinweise darauf, dass unter entzündlichen Bedingungen, in dieser Studie durch

TLR9-Stimulation simuliert, eine Modulation der Rezeptorexpression stattfindet. Die TLR9-Stimulation mittels CpG führte zu einem signifikanten Anstieg der α1A-, α2B- und der β3-ADRs.

Die Stimulation des α1A-Rezeptors vermittelte eine signifikante Steigerung der IL-10-Produktion. Auch eine Modulation des α2B-Rezeptors zeigte antiinflammatorische Effekte. Insbesondere die Antagonisierung führte zu einer signifikanten Erhöhung der IL-10-Produktion sowie zu einer Reduktion der IL-6-Expression.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Agonisierung der β-ADRs antiinflammatorische Prozesse durch eine verstärkte IL-10-Produktion induziert. Wie bereits in der Literatur beschrieben, scheint der β2-ADR-Subtyp eine dominante Rolle einzunehmen.

Zukünftige Studien sollten die zugrunde liegenden Signalkaskaden differenziert untersuchen, um die Subtypspezifität der immunmodulatorischen Prozesse besser zu verstehen. Dies erscheint besonders relevant, da nach spezifischer β-ADR-Ligation in unserer Studie auch proinflammatorisches IL-6 detektiert wurde. Auch in murinen Modellen konnte gezeigt werden, dass Zellen, die zur IL-10-Produktion angeregt werden, gleichzeitig proinflammatorische Zytokine wie IL-6 und TNF-α freisetzen (16,17,19).

Es gibt Hinweise darauf, dass die Immunmodulation nicht ausschließlich über die klassischen *GPCR*-vermittelten Signalwege erfolgt. Um fundierte Aussagen über die immunmodulatorische Funktion humaner BZ treffen zu können, sollten daher auch alternative Signaltransduktionswege berücksichtigt werden, insbesondere die Aktivierung der Kinasen β-Arrestin, p38, *ERK* und MAPK sowie der damit verknüpften Transkriptionsfaktoren wie *CREB* und *NF-κB* (16,132,151,174).

Die vorliegenden Daten deuten insgesamt darauf hin, dass die katecholaminerge Modulation der IL-10-Produktion menschlicher B-Zellen eine vielversprechende therapeutische Strategie zur gezielten Steuerung der Immunantwort darstellen könnte (18). Ein potentieller Ansatz wäre, die bei Patientin mit RA beobachtete verminderte IL-10-Konzentration im Serum therapeutisch anzuheben (223,224).

Darüber hinaus erscheint es bedeutsam, zusätzliche Interleukine sowie die zeitabhängigen Muster der Rezeptorexpression zu untersuchen, um den dynamischen Verlauf immunologischer Prozesse besser erfassen zu können. Dies ist insbesondere relevant im Hinblick auf die Unterscheidung zwischen akuten und chronischen Entzündungsstadien.

In unserer Studie konnte in einem Probandenansatz der NET sowie die MAO-A und MAO-B in den BZ nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse liefern erste Hinweise auf potenzielle auto- und parakrine Wirkmechanismen katecholaminproduzierender BZ. Um diese Befunde zu

validieren und ihre funktionelle Bedeutung zu bewerten, sind jedoch weiterführende Untersuchungen an größeren Stichproben erforderlich, insbesondere im Hinblick auf die Fähigkeit der Zellen, endogene Katecholamine zu synthetisieren. Die Proteinexpression sollte dabei nicht nur über WB analysiert, sondern idealerweise ergänzende Methoden bestätigt werden. Hierzu bieten sich Durchflusszytometrie, Immunfluoreszenz, mRNA-Analysen mittels qPCR-Methode (quantitative Polymerase-Kettenreaktion) oder RNA-Sequenzierung an. Zusätzlich könnte die Bestimmung der NE-Konzentration nach BZ-Stimulation mittel *ELISA* weitere Hinweise auf eine funktionelle Katecholaminproduktion in diesen Zellen liefern.

Die in unseren Untersuchungen beobachteten Unterschiede zwischen murinen und humanen BZ könnten auf abweichende epigenetische oder transkriptionelle Regulationsmechanismen zurückzuführen sein (219). Anders als bei Mäusen konnte in humanen BZ bislang keine klar definierte Subpopulation identifiziert werden, die konsistent IL-10 produziert. Dies erschwert die Übertragbarkeit muriner Ergebnisse auf die potenzielle Funktion von B_{REGs} beim Menschen (19).

In der vorliegenden Studie wurden BZ gesunder Probenden verwendet und es wurde eine akute immunologische Reaktion durch gezielte TLR9-Stimulation hervorgerufen. Im Hinblick auf potenzielle therapeutische Ansätze erscheint es jedoch notwendig, zukünftige Forschungsarbeiten gezielt an pathogenen Zelllinien aus chronisch erkrankten RA-Patienten auszurichten.

Abschließend ist zu betonen, dass die vorliegenden Ergebnisse aus *in vitro* -Studien stammen. Das Immunsystem stellt jedoch ein hochkomplexes, vielschichtiges Netzwerk dar, dessen Prozesse im Gesamtorganismus wechselseitig beeinflusst werden. Um ein umfassenderes Verständnis der immunmodulatorischen Mechanismen zu erlangen, sind daher weiterführende *in vivo*-Untersuchungen notwendig.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Ehlert U, von Känel R. Psychoendokrinologie und Psychoimmunologie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2011. 37–77 p.
2. Gulbins E, Lang F. Immunsystem. In: Physiologie des Menschen. Berlin,Heidelberg: Springer; 2010. p. 503–14.
3. Koretzky GA. Multiple roles of CD4 and CD8 in T Cell activation. J Immunol. 2010;185(5):2643–4.
4. Hauri-Hohl M, Trück J. Physiologie der B- und T-Lymphozyten. In: Pädiatrie: Grundlagen und Praxis. Springer, Berlin, Heidelberg; 2020. p. 975–85.
5. Rink L, Kruse A, Haase H. Immunologie für Einsteiger 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag; 2012.
6. Bugatti S, Vitolo B, Caporali R, Montecucco C, Manzo A. B cells in rheumatoid arthritis: From pathogenic players to disease biomarkers. Biomed Res Int. 2014;(1):681678.
7. Tretter T, Lorenz HM. Regulatorische B-Zellen und ihre Funktion im Erhalt der peripheren Toleranz. Z Rheumatol. 2010;69(9):813–7.
8. Murphy K, Weaver C. Janeway's Immunobiology. Garland science. 2016.
9. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. Nat Rev Immunol. 2015;15(3):160–71.
10. Scheuermann RH, Racila E. CD19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy. Leuk Lymphoma. 1995;18(5–6):385–97.
11. Wang K, Wei G, Liu D. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. Exp Hematol Oncol. 2012;1(1):1–7.
12. Tedder TF. CD19: A promising B cell target for rheumatoid arthritis. Vol. 5, Nature Reviews Rheumatology. 2009. p. 572–7.
13. Tangye SG, Tarlinton DM. Memory B cells: Effectors of long-lived immune responses. Eur J Immunol. 2009;39(8):2065–75.
14. Honke N, Lowin T, Opgenoorth B, Shaabani N, Lautwein A, Teijaro JR, et al. Endogenously produced catecholamines improve the regulatory function of TLR9-activated B cells. PLoS Biol. 2022;20(1):1–30.
15. 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.
16. Bankó Z, Pozsgay J, Szili D, Tóth M, Gáti T, Nagy G, et al. Induction and Differentiation of IL-10–Producing Regulatory B Cells from Healthy Blood Donors and Rheumatoid Arthritis Patients. J Immunol. 2017;198(4):1512–20.
17. Glass MC, Glass DR, Oliveria JP, 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).
18. Bouaziz JD, Calbo S, Maho-Vaillant M, Saussine A, Bagot M, Bensussan A, et al. IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4+ T-cell activation in vitro. Eur J Immunol. 2010;40(10):2686–91.
19. Lighaam LC, Unger PPA, Vredevoogd DW, Verhoeven D, Vermeulen E, Turksma AW, et al. In vitro-induced human IL-10+ B cells do not show a subset-defining marker signature and plastically co-express IL-10 with pro-inflammatory cytokines. Front Immunol. 2018;9(1913).
20. Shlomchik MJ. Sites and Stages of Autoreactive B Cell Activation and Regulation. Vol. 28, Immunity. Cell Press; 2008. p. 18–28.
21. Carter RH, Fearon DT. CD19: Lowering the Threshold for Antigen Receptor Stimulation of B Lymphocytes. Science (80-). 1992;256(5053):105–7.
22. Del Nagro CJ, Otero DC, Anzelon AN, Anzelon SN, Kolla R V., Rickert RC. CD19 function in central and peripheral B-cell development. Immunol Res. 2005;31(2):119–31.
23. Feuchtenberger M, Kneitz C, Tony HP. Zytokine. Z Rheumatol. 2007;66(4):297–303.
24. Horneff G. Zytokine in der pädiatrischen Rheumatologie. In: Pädiatrische Rheumatologie. Springer, Berlin, Heidelberg; 2021. p. 55–75.

25. Gardam MA, Keystone EC, Menzies R, Manners S, Skamene E, Long R, et al. Anti-tumour necrosis factor agents and tuberculosis risk: Mechanisms of action and clinical management. Vol. 3, Lancet Infectious Diseases. Lancet Publishing Group; 2003. p. 148–55.
26. Jang DI, Lee AH, Shin HY, Song HR, Park JH, Kang TB, et al. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-α) in Autoimmune Disease and Current TNF-α Inhibitors in Therapeutics. Int J Mol Sci. 2021;22(5):2719.
27. Sethi JK, Hotamisligil GS. Metabolic Messengers: tumour necrosis factor. Nat Metab. 2021;3(10):1302–12.
28. Han Y-P, Tuan T-L, Wu H, Hughes M, Garner WL. TNF-α stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-κB mediated induction of MT1-MMP. J Cell Sci. 2001;114(1):131–9.
29. Hayashi S, Matsubara T, Fukuda K, Funahashi K, Hashimoto M, Maeda T, et al. Predictive factors for effective selection of Interleukin-6 inhibitor and tumor necrosis factor inhibitor in the treatment of rheumatoid arthritis. Sci Rep. 2020;10(1):16645.
30. Zhang Y, Lin J-X, Vilček J. Interleukin-6 induction by tumor necrosis factor and interleukin-1 in human fibroblasts involves activation of a nuclear factor binding to a kappa B-like sequence. Mol Cell Biol. 1990;10(7):3818–23.
31. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima SI, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF-α: Structure, function and interaction with anti-TNF agents. Rheumatology. 2010;49(7):1215–28.
32. Rieckmann P, Tuscano JM, Kehrl JH. Tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-6 (IL-6) in B-lymphocyte function. Methods A Companion to Methods Enzymol. 1997;11(1):128–32.
33. Tanaka T, Narazaki M, Masuda K, Kishimoto T. Regulation of IL-6 in immunity and diseases. Adv Exp Med Biol. 2016;79–88.
34. Grebenciucova E, VanHaerents S. Interleukin 6: at the interface of human health and disease. Front Immunol. 2023;14.
35. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. Nat Immunol. 2015;16(5):448–57.
36. Confalone E, D'Alessio G, Furia A. IL-6 Induction by TNFα and IL-1β in an Osteoblast-Like Cell Line. Int J Biomed Sci. 2010 Jun;6(2):135.
37. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Il-6 in inflammation, Immunity, And disease. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014;6(10).
38. Fäldt J, Wernstedt I, Fitzgerald SM, Wallenius K, Bergström G, Jansson JO. Reduced exercise endurance in interleukin-6-deficient mice. Endocrinology. 2004;145(6):2680–6.
39. Krieg AM. Immune effects and mechanisms of action of CpG motifs. Vaccine. 2000;19(6):618–22.
40. Goldman M, Velu T, Pretolani M. Interleukin-10. Actions and therapeutic potential. BioDrugs. 1997;7(1):6–14.
41. Pongratz G, Melzer M, Straub RH. The sympathetic nervous system stimulates anti-inflammatory B cells in collagen-type II-induced arthritis. Ann Rheum Dis. 2012;71(3):432–9.
42. Groux RH, Bigler M, De Vries JE, -Grazia M. Inhibitory and Stimulatory Effects of IL-10 on Human CD8+ T Cells. J Immunoloy. 1998;160:3188–93.
43. Lindner SD. Funktion und pathophysiologische Bedeutung Granzym B-exprimierender regulatorischer B-Zellen. Universitätsklinikum Ulm; 2015.
44. Clarke CJP, Hales A, Hunt A, Foxwell BMJ. IL-10-mediated suppression of TNF-α production is independent of its ability to inhibit NFκB activity. Eur J Immunol. 1998;28(5):1719–26.
45. 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.
46. Llorente L, Richaud-Patin Y, Fior R, Alcocer-Varela J, Wijdenes J, Fourrier BM, et al. In vivo production of interleukin-10 by non–t cells in rheumatoid arthritis, sjögren's syndrome, and systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 1994;37(11):1647–55.
47. Saraiva M, Vieira P, O'Garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. J Exp Med. 2020;217(1).
48. Walter M. The Molecular Basis of IL-10 Function: From Receptor Structure to the Onset of Signaling. In: Interleukin-10 in Health and Disease Current Topics in Microbiology and Immunology. Berlin Heidelberg: Springer Verlag; 2014. p. 191–212.

49. Pongratz G. Das gestresste Immunsystem und Autoimmunität. Aktuelle Rheumatol. 2021;46(3):258–66.
50. Chen JQ, Szodoray P, Zeher M. Toll-Like Receptor Pathways in Autoimmune Diseases. Clin Rev Allergy Immunol. 2016;50(1):1–17.
51. Huang Q, Pope RM. Toll-like receptor signaling: a potential link among rheumatoid arthritis, systemic lupus, and atherosclerosis. J Leukoc Biol. 2010;88(2):253.
52. Ashkar A, Rosenthal K. Toll-like Receptor 9, CpG DNA and Innate Immunity. Curr Mol Med. 2002;2(6):545–56.
53. Krieg AM. The role of CpG motifs in innate immunity. Curr Opin Immunol. 2000;12(1):35–43.
54. Rigby RE, Webb LM, Mackenzie KJ, Li Y, Leitch A, Reijns MAM, et al. RNA:DNA hybrids are a novel molecular pattern sensed by TLR9. EMBO J. 2014;33(6):542–58.
55. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature. 2000;408(6813):740–5.
56. Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. Annu Rev Immunol. 2002;20(1):709–60.
57. Klinman DM. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. Nat Rev Immunol. 2004;4(4):249–59.
58. Dekkers JC, Geenen R, Godaert GLR, Bijlsma JWJ, van Doornen LJP. Elevated sympathetic nervous system activity in patients with recently diagnosed rheumatoid arthritis with active disease. Clin Exp Rheumatol. 2004;22(1):63–70.
59. Moritz Wagner P. CpG-Oligonukleotide : Einfluss auf die Zytokinproduktion und die kostimulatorische Fähigkeit humaner B-Lymphozyten. Ludwig-Maximilians-Universität zu München; 2007.
60. Wu F, Gao J, Kang J, Wang X, Niu Q, Liu J, et al. B Cells in Rheumatoid Arthritis : Pathogenic Mechanisms and Treatment Prospects. Front Immunol. 2021;12:1–14.
61. Lefèvre S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, Dinser R, et al. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. Nat Med. 2009;15(12):1414–22.
62. Malysheva O, Esber A, Baerwald GCO. Änderungen des autonomen Nervensystems bei rheumatoider Arthritis. Aktuelle Rheumatol. 2013;38(4):241–6.
63. De Paz B, Alperi-López M, Ballina-García FJ, Prado C, Mozo L, Gutiérrez C, et al. Interleukin 10 and tumor necrosis factor-α genotypes in rheumatoid arthritis - Association with clinical response to glucocorticoids. J Rheumatol. 2010;37(3):503–11.
64. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TWJ. Rheumatoid arthritis. Lancet. 2010;376(9746):1094–108.
65. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. Lancet. 2016;388(10055):2023–38.
66. Heck CM. Charakterisierung von Fibroblasten-vermittelten Veränderungen bei der Gefäßneubildung im SCID-Maus-Modell der rheumatoiden Arthritis. Justus-Liebig-Universität Gießen; 2024.
67. McInnes IB, Schett G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. N Engl J Med. 2011;365(23):2205–19.
68. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: Key effector cells in rheumatoid arthritis. Immunol Rev. 2010;233(1):233–55.
69. Ma Y, Pope R. The Role of Macrophages in Rheumatoid Arthritis. Curr Pharm Des. 2005;11(5):569–80.
70. Choy EHS, Panayi GS. Cytokine Pathways and Joint Inflammation in Rheumatoid Arthritis. N Engl J Med. 2001;344(12):907–16.
71. Daien CI, Gailhac S, Mura T, Audo R, Combe B, Hahne M, et al. Regulatory B10 cells are decreased in patients with rheumatoid arthritis and are inversely correlated with disease activity. Arthritis Rheumatol. 2014;66(8):2037–46.
72. Rosengren S, Wei N, Kalunian KC, Zvaifler NJ, Kavanaugh A, Boyle DL. Elevated autoantibody content in rheumatoid arthritis synovia with lymphoid aggregates and the effect of rituximab. Arthritis Res Ther. 2008;10(5):1–9.
73. Panayi G. B cells: A fundamental role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis? Rheumatology. 2005;44(2):3–7.
74. Cronstein BN. Interleukin-6: A key mediator of systemic and local symptoms in rheumatoid arthritis. Bull NYU Hosp Jt Dis. 2007;65(1):11–5.

75. Wong PKK, Campbell IK, Egan PJ, Ernst M, Wicks IP. The role of the interleukin-6 family of cytokines in inflammatory arthritis and bone turnover. Arthritis Rheum. 2003;48(5):1177–89.
76. Looney RJ. B Cell-Targeted Therapy for Rheumatoid Arthritis An Update on the Evidence. 2006;66(5):625–39.
77. O'Neill SK, Glant TT, Finnegan A. The role of B cells in animal models of rheumatoid arthritis. Front Biosci. 2007;12(5):1722–36.
78. Gause A, Berek C. Role of B cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: Potential implications for treatment. BioDrugs. 2001;15(2):73–9.
79. Lipsky PE. Interleukin-6 and rheumatic diseases. Arthritis Res Ther. 2006;8(2):1–5.
80. Alonzi BT, Fattori E, Lazzaro D, Costa P, Probert L, Kollias G, et al. Interleukin 6 Is Required for the Development of Collagen-induced Arthritis. 1998;187(4):461–8.
81. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. Annu Rev Immunol. 1996;14(1):397–440.
82. Gravallese EM. Bone destruction in arthritis. Ann Rheum Dis. 2002;61(2):84–6.
83. Thwaites R, Chamberlain G, Sacre S. Emerging role of endosomal toll-like receptors in rheumatoid arthritis. Front Immunol. 2014;5(1).
84. Ouboussad L, Burska AN, Melville A, Buch MH. Synovial Tissue Heterogeneity in Rheumatoid Arthritis and Changes With Biologic and Targeted Synthetic Therapies to Inform Stratified Therapy. Front Med. 2019;6(45).
85. Gao D, Gao X, Yang F, Wang Q. Neuroimmune Crosstalk in Rheumatoid Arthritis. Int J Mol Sci. 2022;23(8158).
86. Mok CC. Rituximab for the treatment of rheumatoid arthritis: An update. Drug Des Devel Ther. 2014;8:87–100.
87. Miyagaki T, Fujimoto M, Sato S. Regulatory B cells in human inflammatory and autoimmune diseases: from mouse models to clinical research. Int Immunol. 2015;27(10):495–504.
88. Cohen MD, Keystone E. Rituximab for Rheumatoid Arthritis. Rheumatol Ther. 2015;2(2):99–111.
89. Meednu N, Zhang H, Owen T, Sun W, Wang V, Cistrone C, et al. Production of RANKL by Memory B Cells: A Link between B Cells and Bone Erosion in Rheumatoid Arthritis. Arthritis Rheumatol. 2016;68(4):805–16.
90. Tracey KJ. The inflammatory reflex. Nature. 2002;420(6917):853–9.
91. Pongratz G, Straub RH. The sympathetic nervous response in inflammation. Arthritis Res Ther. 2014;16(504):1–12.
92. Malysheva O, Pierer M, Wagner U, Baerwald CGO. Stress und Rheuma. Z Rheumatol. 2010;69(6):539–43.
93. Minneman KP, Esbenshade TA. α1-Adrenergic receptor subtypes. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1994;34:117–33.
94. Kerage D, Sloan EK, Mattarollo SR, McCombe PA. Interaction of neurotransmitters and neurochemicals with lymphocytes. J Neuroimmunol. 2019;332:99–111.
95. Straub RH, Pongratz G. Role of peripheral nerve fibres in acute and chronic inflammation in arthritis. Nat Rev Rheumatol. 2013;9(2):117–26.
96. Daubner SC, Le T, Wang S. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. Arch Biochem Biophys. 2011;508(1):1–12.
97. Molinoff PB, Axelrod J. Biochemistry of Catecholamines. Annu Rev Biochem. 1971;40(1):465–500.
98. Chhatar S, Lal G. Role of adrenergic receptor signalling in neuroimmune communication. Curr Res Immunol. 2021;2:202–17.
99. Wimalasena K. Vesicular Monoamine Transporters: Structure-Function, Pharmacology, and Medicinal Chemistry. Med Res Rev. 2011;31(4):483–519.
100. Ziegler MG, Xuping BAO, Kennedy BP, Joyner A, Enns R. Location, development, control, and function of extraadrenal phenylethanolamine N-methyltransferase. Ann N Y Acad Sci. 2002;971:76–82.
101. Mandela P, Ordway GA. The norepinephrine transporter and its regulation. J Neurochem. 2006;97(2):310–33.
102. Masson J, Sagné C, Hamon M, El Mestikawy S. Neurotransmitter transporters in the central nervous system. Pharmacol Rev. 1999;51(3):439–64.

103. Gogos JA, Morgan M, Luine V, Santha M, Ogawa S, Pfaff D, et al. Catechol-O-methyltransferase-deficient mice exhibit sexually dimorphic changes in catecholamine levels and behavior. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(17):9991–6.
104. Marino F, Cosentino M, Bombelli R, Ferrari M, Lecchini S, Frigo G. Endogenous catecholamine synthesis, metabolism, storage, and uptake in human peripheral blood mononuclear cells. Exp Hematol. 1999;27(3):489–95.
105. Balsa MD, Gómez N, Unzeta M. Characterization of monoamine oxidase activity present in human granulocytes and lymphocytes. BBA - Gen Subj. 1989;992(2):140–4.
106. Kvetnansky R, Sabban EL, Palkovits M. Catecholaminergic systems in stress: Structural and molecular genetic approaches. Physiol Rev. 2009;89(2):535–606.
107. Flierl MA, Rittirsch D, Huber-Lang M, Vidya Sarma J, Award P. Catecholamines - Crafty weapons in the inflammatory arsenal of immune/inflammatory cells or opening Pandora's box? Mol Med. 2008;14(3–4):195–204.
108. Hamm HE. The many faces of G protein signaling. J Biol Chem. 1998;273(2):669–72.
109. Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The Sympathetic Nerve — An Integrative Interface between Two Supersystems : The Brain and the Immune System. 2000;52(4):595–638.
110. Dudel J. Grundlagen der Zellphysiologie. In: Physiologie des Menschen. Springer Berlin Heidelberg; 2000. p. 3–19.
111. Docherty JR. Subtypes of functional α1- and α2-adrenoceptors. Eur J Pharmacol. 1998;361(1):1–15.
112. Molinoff PB. α- and β-Adrenergic Receptor Subtypes: Properties, Distribution and Regulation. Drugs. 1984;28(2):1–15.
113. Philipp M, Hein L. Adrenergic receptor knockout mice: Distinct functions of 9 receptor subtypes. Pharmacol Ther. 2004;101(1):65–74.
114. Pongratz G, Straub RH. Role of the sympathetic nervous system in chronic inflammation. Z Rheumatol. 2023;82(6):451–61.
115. Gyires K, Zádori ZS, Török T, Mátyus P. α2-Adrenoceptor subtypes-mediated physiological, pharmacological actions. Neurochem Int. 2009;55(7):447–53.
116. Gilsbach, R., Hein L. Presynaptic Metabotropic Receptors for Acetylcholine and Adrenaline/Noradrenaline. In: Pharmacology of Neurotransmitter Release Handbook of Experimental Pharmacology. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag; 2008. p. 261–88.
117. Hein L, Altman JD, Kobilka BK. Two functionally distinct α2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. Nature. 1999;402(6758):181–4.
118. Trendelenburg AU, Philipp M, Meyer A, Klebroff W, Hein L, Starke K. All three α2-adrenoceptor types serve as autoreceptors in postganglionic sympathetic neurons. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2003;368(6):504–12.
119. Hein L. Das β-adrenerge System: Pharmakologische Aspekte. Pharm Unserer Zeit. 2004;33(6):438–41.
120. Franco R, Pacheco R, Lluis C, Ahern GP, O'Connell PJ. The emergence of neurotransmitters as immune modulators. Trends Immunol. 2007;28(9):400–7.
121. Chen H, Zhang S, Hou R, Liu H. Gi-protein-coupled β1-adrenergic receptor: re-understanding the selectivity of β1-adrenergic receptor to G protein. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2022;54(8):1043–8.
122. Cosentino M, Bombelli R, Ferrari M, Marino F, Rasini E, Maestroni GJM, et al. HPLC-ED measurement of endogenous catecholamines in human immune cells and hematopoietic cell lines. Life Sci. 2000;68(3):283–95.
123. Qiu YH, Peng Y-P, Jiang JM, Wang JJ. Expression of Tyrosine Hydroxylase in Lymphocytes and Effect of Endogenous Catecholamines on Lymphocyte Function. Neuroimmunomodulation. 2004;11(2):75–83.
124. Elenkov IJ. Effects of Catecholamines on the Immune Response. NeuroImmune Biol. 2007;7:189–206.
125. Kin NW, Sanders VM. It takes nerve to tell T and B cells what to do. J Leukoc Biol. 2006;79(6):1093–104.
126. Padro CJ, Sanders VM. Neuroendocrine regulation of inflammation. Semin Immunol. 2014;26(5):357–68.

127. Heijnen CJ, Van der Voort CR, Wulffraat N, Van der Net J, Kuis W, Kavelaars A. Functional α1-adrenergic receptors on leukocytes of patients with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. J Neuroimmunol. 1996;71(1–2):223–6.
128. Bellinger DL, Millar BA, Perez S, Carter J, Wood C, ThyagaRajan S, et al. Sympathetic modulation of immunity: Relevance to disease. Cell Immunol. 2008;252(1–2):27–56.
129. Nance DM, Sanders VM. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). Brain Behav Immun. 2007;21(6):736–45.
130. Kohm AP, Sanders VM. Norepinephrine: A messenger from the brain to the immune system. Immunol Today. 2000;21(11):539–42.
131. Barnes PJ. Effect of β agonists on inflammatory cells. J Allergy Clin Immunol. 1999;104(2):S10–7.
132. Bellinger DL, Wood C, Wergedal JE, Lorton D. Driving β2- While Suppressing α-Adrenergic Receptor Activity Suppresses Joint Pathology in Inflammatory Arthritis. Front Immunol. 2021;12.
133. Ricci A, Bronzetti E, Conterno A, Greco S, Mulatero P, Schena M, et al. α1-Adrenergic receptor subtypes in human peripheral blood lymphocytes. Hypertension. 1999;33:708–12.
134. Grisanti LA, Perez DM, Porter JE. Modulation of Immune Cell Function by α1-Adrenergic Receptor Activation. Curr Top Membr. 2011;67:113–38.
135. Starkie RL, Rolland J, Febbraio MA. Effect of adrenergic blockade on lymphocyte cytokine production at rest and during exercise. Am J Physiol - Cell Physiol. 2001;281(4):1233–40.
136. Tsao CW, Lin YS, Cheng JT. Inhibition of immune cell proliferation with haloperidol and relationship of tyrosine hydroxylase expression to immune cell growth. Life Sci. 1998;62(21):335–44.
137. Laukova M, Vargovic P, Vlcek M, Lejavova K, Hudecova S, Krizanova O, et al. Catecholamine production is differently regulated in splenic T- and B-cells following stress exposure. Immunobiology. 2013;218(5):780–9.
138. Bergquist J, Tarkowski A, Ekman R, Ewing A. Discovery of endogenous catecholamines in lymphocytes and evidence for catecholamine regulation of lymphocyte function via an autocrine loop. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91(26):12912–6.
139. Reguzzoni M, Cosentino M, Rasini E, Marino F, Ferrari M, Bombelli R, et al. Ultrastructural localization of tyrosine hydroxylase in human peripheral blood mononuclear cells: Effect of stimulation with phytohaemagglutinin. Cell Tissue Res. 2002;310(3):297–304.
140. Bergquist J, Josefsson E, Tarkovski A, Ekman R, Ewing A. Measurements of catecholamine-mediated apoptosis of immunocompetent cells by capillary electrophoresis. Electrophoresis. 1997;18(10):1760–6.
141. Amenta F, Bronzetti E, Cantalamessa F, El-Assouad D, Felici L, Ricci A, et al. Identification of dopamine plasma membrane and vesicular transporters in human peripheral blood lymphocytes. J Neuroimmunol. 2001;117(1–2):133–42.
142. Capellino S, Cosentino M, Wolff C, Schmidt M, Grifka J, Straub RH. Catecholamine-producing cells in the synovial tissue during arthritis: Modulation of sympathetic neurotransmitters as new therapeutic target. Ann Rheum Dis. 2010;69(10):1853–60.
143. Bond PA, Cundall RL. Properties of monoamine oxidase (MAO) in human blood platelets, plasma, lymphocytes and granulocytes. Clin Chim Acta. 1977;80(2):317–26.
144. Balsa D, Gomez N, Unzeta M. Monoamine oxidase activities in lymphocytes and granulocytes taken from pig blood. Biochem Pharmacol. 1987;36(17):2723–8.
145. Thorpe LW, Westlund KN, Kochersperger LM, Abell CW, Denney RM. Immunocytochemical localization of monoamine oxidases A and B in human peripheral tissues and brain. J Histochem Cytochem. 1987;35(1):23–32.
146. Ostadkarampour M, Putnins EE. Monoamine Oxidase Inhibitors: A Review of Their Anti-Inflammatory Therapeutic Potential and Mechanisms of Action. Front Pharmacol. 2021;12(676239).
147. Schorr EC, Arnason BGW. Interactions between the Sympathetic Nervous System and the Immune System. Brain Behav Immun. 1999;13(4):271–8.
148. Friedman EM, Irwin MR. Modulation of immune cell function by the autonomic nervous system. Pharmacol Ther. 1997;74(1):27–38.

149. Baerwald C, Graefe C, Muhl C, Wichert P v., Krause A. Beta2-adrenerge Rezeptoren auf mononukleären Zellen des Blutes bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen. Aktuelle Rheumatol. 1995;20(2):43–8.
150. Straub RH, Westermann J, Schölmerich J, Falk W. Dialogue between the CNS and the immune system in lymphoid organs. Immunol Today. 1998;19(9):409–13.
151. Lorton D. Molecular mechanisms underlying β-adrenergic receptor-mediated cross-talk between sympathetic neurons and immune cells. Int J Mol Sci. 2015;16:5635–65.
152. Baerwald CGO, Laufenberg M, Specht T, Von Wichert P, Burmester GR, Krause A. Impaired sympathetic influence on the immune response in patients with rheumatoid arthritis due to lymphocyte subset-specific modulation of β2-adrenergic receptors. Br J Rheumatol. 1997;36(12):1262–9.
153. Pongratz G, Straub RH. Chronic Effects of the Sympathetic Nervous System in Inflammatory Models. Neuroimmunomodulation. 2023;30(1):113–34.
154. Scanzano A, Cosentino M. Adrenergic regulation of innate immunity: A review. Front Pharmacol. 2015;6:171.
155. Fernandez CJ, Hanna FWF, Pacak K, Nazari MA. Catecholamines and blood pressure regulation. Endocr Hypertens. 2023;19–34.
156. Miller LE, Grifka J, Schölmerich J, Straub RH. Norepinephrine from synovial tyrosine hydroxylase positive cells is a strong indicator of synovial inflammation in rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 2002;29(3):427–35.
157. Miller LE, Jüsten H, Schcölmerich J, Straub RH. The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages. FASEB J. 2000;14(13):2097–107.
158. Spengler RN, Allen RM, Remick DG, Strieter RM, Kunkel SL. Stimulation of α-adrenergic receptor augments the production of macrophage-derived tumor necrosis factor. J Immunol. 1990;145(5):1430–4.
159. Severn A, Rapson NT, Hunter CA, Liew FY. Regulation of tumor necrosis factor production by adrenaline and beta-adrenergic agonists. J Immunol. 1992;148(11):3441–5.
160. Jenei-Lanzl Z, Zwingenberg J, Lowin T, Anders S, Straub RH. Proinflammatory receptor switch from Gαs to Gαi signaling by β-arrestin-mediated PDE4 recruitment in mixed RA synovial cells. Brain Behav Immun. 2015;50:266–74.
161. Rouppe Van Der Voort C, Kavelaars A, Van De Pol M, Heijnen CJ. Neuroendocrine mediators up-regulate α (1b)- and α (1d)-adrenergic receptor subtypes in human monocytes. J Neuroimmunol. 1999;95(1–2):165–73.
162. Capellino S, Weber K, Gelder M, Härle P, Straub RH. First appearance and location of catecholaminergic cells during experimental arthritis and elimination by chemical sympathectomy. Arthritis Rheum. 2012;64(4):1110–8.
163. Kuis W, De Jong-De Vos Van Steenwijk CCE, Sinnema G, Kavelaars A, Prakken B, Helders PJM, et al. The autonomic nervous system and the immune system in juvenile rheumatoid arthritis. Brain Behav Immun. 1996;10(4):387–98.
164. Wahle M, Kölker S, Krause A, Burmester GR, Baerwald CGO. Impaired catecholaminergic signalling of B lymphocytes in patients with chronic rheumatic diseases. Ann Rheum Dis. 2001;60(5):505–10.
165. Schaible HG, Straub RH. Function of the sympathetic supply in acute and chronic experimental joint inflammation. Auton Neurosci. 2014;182:55–64.
166. Straub RH, Dhabhar FS, Bijlsma JWJ, Cutolo M. How psychological stress via hormones and nerve fibers may exacerbate rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2005;52(1):16–26.
167. Straub, R. H.; Cutolo M. Involvement of the hypothalamic–pituitary–adrenal/gonadal axis and the peripheral nervous system in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2001;44(3):493–507.
168. Jenei-Lanzl Z, Capellino S, Kees F, Fleck M, Lowin T, Straub RH. Anti-inflammatory effects of cell-based therapy with tyrosine hydroxylase-positive catecholaminergic cells in experimental arthritis. Ann Rheum Dis. 2015;74(2):444–51.
169. Wahle M, Krause A, Ulrichs T, Jonas D, Von Wichert P, Burmester GR, et al. Disease Activity Related Catecholamine Response of Lymphocytes from Patients with Rheumatoid Arthritis. Ann N Y Acad Sci. 1999;876(1):287–97.

170. Kavelaars A. Regulated expression of α-1 adrenergic receptors in the immune system. Brain Behav Immun. 2002;16(6):799–807.
171. Lombardi MS, Kavelaars A, Schedlowski M, Bijlsma JWJ, Okihara KL, Pol M, et al. Decreased expression and activity of G-protein-coupled receptor kinases in peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis. FASEB J. 1999;13(6):715–25.
172. Xu BY, Ärlehag L, Rantapää-Dahlquist SB, Lefvert AK. β2 adrenoceptor gene single nucleotide polymorphisms are associated with rheumatoid arthritis in northern Sweden. Ann Rheum Dis. 2005;64(5):773–6.
173. Sanders VM, Straub RH. Norepinephrine, the β-adrenergic receptor, and immunity. Brain Behav Immun. 2002;16(4):290–332.
174. Honke N, Wiest CJ, Pongratz G. β2-Adrenergic Receptor Expression and Intracellular Signaling in B Cells Are Highly Dynamic during Collagen-Induced Arthritis. Biomedicines. 2022;10(1950).
175. Cheng X, Lowin T, Honke N, Pongratz G. Components of the sympathetic nervous system as targets to modulate inflammation-rheumatoid arthritis synovial fibroblasts as neuron-like cells? J Inflamm. 2023;20(9).
176. Härle P, Möbius D, Carr DJJ, Schölmerich J, Straub RH. An opposing time-dependent immune-modulating effect of the sympathetic nervous system conferred by altering the cytokine profile in the local lymph nodes and spleen of mice with type II collagen-induced arthritis. Arthritis Rheum. 2005;52(4):1305–13.
177. Del Rey A, Wolff C, Wildmann J, Randolf A, Hahnel A, Besedovsky HO, et al. Disrupted brain-immune system-joint communication during experimental arthritis. Arthritis Rheum. 2008;58(10):3090–9.
178. Malfait A-M, Malik AS, Marinova-Mutafchieva L, Butler DM, Maini RN, Feldmann M. The β2-Adrenergic Agonist Salbutamol Is a Potent Suppressor of Established Collagen-Induced Arthritis: Mechanisms of Action. J Immunol. 1999;162(10):6278–83.
179. 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.
180. Fillatreau S, Gray D, Anderton SM. Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology. Nat Rev Immunol. 2008;8(5):391–7.
181. Beakke MK. Density Gradient Centrifugation: A New Separation Technique. J Am Chem Soc. 1951;73(4):1847–8.
182. Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. Cytometry. 1990;11(2):231–8.
183. Oberle V, Soßdorf M, Lösche W. Durchflusszytometrie. In: Hämostaseologie. Berlin, Heidelberg: Springer; 2010. p. 935–9.
184. Cohen J. Statistical power analysis for the behavioral sciences. Hillsdale: Routledge; 1998.
185. Yoshida T, Sakane N, Wakabayashi Y, Umekawa T, Kondo M. Anti-obesity and anti-diabetic effects of CL 316, 243, a highly specific β3-adrenoceptor agonist, in yellow KK mice. Life Sci. 1994;54(7):491–8.
186. Bloom JD, Dutia MD, Johnson BD, Wissner A, Burns MG, Largis EE, et al. Disodium (R,R)-5-[2-[[2-(3-Chlorophenyl)-2-hydroxyethyl]amino]propyl]-1,3-benzodioxole-2,2-dicarboxylate (cl 316,243). A Potent β-Adrenergic Agonist Virtually Specific for β3 Receptors. A Promising Antidiabetic and Antiobesity Agent. J Med Chem. 1992;35(16):3081–4.
187. Hahn MK, Robertson D, Blakely RD. A mutation in the human norepinephrine transporter gene (SLC6A2) associated with orthostatic intolerance disrupts surface expression of mutant and wild-type transporters. J Neurosci. 2003;23(11):4470–8.
188. Dmitriev AD, Factor MI, Segal OL, Pavlova E V., Massino YS, Smirnova MB, et al. Western blot analysis of human and rat serotonin transporter in platelets and brain using site-specific antibodies: Evidence that transporter undergoes endoproteolytic cleavage. Clin Chim Acta. 2005;356(1–2):76–94.
189. Stolk RF, Reinema F, van der Pasch E, Schouwstra J, Bressers S, van Herwaarden AE, et al. Phenylephrine impairs host defence mechanisms to infection: a combined laboratory study in mice and translational human study. Br J Anaesth. 2021;126(3):652–64.
190. García-Sáinz JA, Vázquez-Prado J, Del Carmen Medina L. α1-Adrenoceptors: function and phosphorylation. Eur J Pharmacol. 2000;389(1):1–12.

191. Reiter E, Lefkowitz RJ. GRKs and b-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. TRENDS Endocrinol Metab. 2006;17(4):159–65.
192. Urban JD, Clarke WP, Von Zastrow M, Nichols DE, Kobilka B, Weinstein H, et al. Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. J Pharmacol Exp Ther. 2007;320(1):1–13.
193. Shih JC, Chen K. Regulation of MAO-A and MAO-B Gene Expression. Curr Med Chem. 2004;11(15):1995–2005.
194. Chen R, Dou X-K, Dai M-S, Sun Y, Sun S-J, Wu Y. The role of dexmedetomidine in immune tissue and inflammatory diseases: a narrative review. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2022;26(21):8030–8.
195. Chen R, Sun Y, Lv J, Dou X, Dai M, Sun S, et al. Effects of Dexmedetomidine on Immune Cells: A Narrative Review. Front Pharmacol. 2022;13.
196. Beisel C, Jordan-Paiz A, Köllmann S, Ahrenstorf AE, Padoan B, Barkhausen T, et al. Sex differences in the percentage of IRF5 positive B cells are associated with higher production of TNF-α in women in response to TLR9 in humans. Biol Sex Differ. 2023;14(1):1–11.
197. Sanders VM. The role of adrenoceptor-mediated signals in the modulation of lymphocyte function. Adv Neuroimmunol. 1995;5(3):283–98.
198. DeGraff JL, Gagnon AW, Benovic JL, Orsini MJ. Role of arrestins in endocytosis and signaling of α2-adrenergic receptor subtypes. J Biol Chem. 1999;274(16):11253–9.
199. Yu XY, Lin SG, Wang XM, Liu Y, Zhang B, Lin QX, et al. Evidence for coexistence of three β-adrenoceptor subtypes in human peripheral lymphocytes. Clin Pharmacol Ther. 2007;81(5):654–8.
200. Sanders VM. The beta2-adrenergic receptor on T and B lymphocytes: Do we understand it yet? Brain Behav Immun. 2012;26(2):195–200.
201. Seifert M, Przekopowitz M, Taudien S, Lollies A, Ronge V, Drees B, et al. Functional capacities of human igm memory b cells in early inflammatory responses and secondary germinal center reactions. Proc Natl Acad Sci. 2015;112(6):E546–55.
202. Podojil JR, Sanders VM. CD86 and β2-adrenergic receptor stimulation regulate B-cell activity cooperatively. Trends Immunol. 2005;26(4):180–5.
203. Pongratz G, McAlees JW, Conrad DH, Erbe RS, Haas KM, Sanders VM. The Level of IgE Produced by a B Cell Is Regulated by Norepinephrine in a p38 MAPK- and CD23-Dependent Manner. J Immunol. 2006;177(5):2926–38.
204. Baker JG. The selectivity of β-adrenoceptor agonists at human β 1-, β 2- and β 3-adrenoceptors. Br J Pharmacol. 2010;160(5):1048–61.
205. Varma DR, Shen H, Deng XF, Peri KG, Chemtob S, Mulay S. Inverse agonist activities of b-adrenoceptor antagonists in rat myocardium. Br J Pharmacol. 1999;127(4):895–902.
206. Peng H, Bond RA, Knoll BJ. The effects of acute and chronic nadolol treatment on β2AR signaling in HEK293 cells. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2011;383(2):209–16.
207. Thanawala VJ, Forkuo GS, Stallaert W, Leff P, Bouvier M, Bond R. Ligand bias prevents class equality among beta-blockers. Curr Opin Pharmacol. 2014;16(1):50–7.
208. Shenoy SK, Drake MT, Nelson CD, Houtz DA, Xiao K, Madabushi S, et al. β-Arrestin-dependent, G Protein-independent ERK1/2 Activation by the β2 Adrenergic Receptor. J Biol Chem. 2006;281(2):1261–73.
209. Reiter E, Ahn S, Shukla AK, Lefkowitz RJ. Molecular Mechanism of β-Arrestin-Biased Agonism at Seven-Transmembrane Receptors. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2012;52(1).
210. Wenzel D, Knies R, Matthey M, Klein AM, Welschoff J, Stolle V, et al. β 2-adrenoceptor antagonist ici 118,551 decreases pulmonary vascular tone in mice via a G i/o protein/nitric oxide-coupled pathway. Hypertension. 2009;54(1):157–63.
211. Sadananda P, Drake MJ, Paton JFR, Pickering AE. A Functional Analysis of the Influence of b 3-adrenoceptors on the Rat Micturition Cycle. Physiol Pharmacol Med Sci Build. 2013;347(2):506–15.
212. Kolmus K, Tavernier J, Gerlo S. β2-Adrenergic receptors in immunity and inflammation: Stressing NF-κB. Brain Behav Immun. 2015;45:297–310.
213. Tanaka S, Imaeda A, Matsumoto K, Maeda M, Obana M, Fujio Y. β2-adrenergic stimulation induces interleukin-6 by increasing Arid5a, a stabilizer of mRNA, through cAMP/PKA/CREB pathway in cardiac fibroblasts. Pharmacol Res Perspect. 2020;8(2).

214. Fan L, Wang S. Biased GPCR Signaling: Possible Mechanisms and Therapeutic Applications. Biochemistry. 2025;64(6):1180–92.
215. Xu X, Kaindl J, Clark MJ, Hübner H, Hirata K, Sunahara RK, et al. Binding pathway determines norepinephrine selectivity for the human β1AR over β2AR. Cell Res. 2020;31(5):569–79.
216. Josefsson E, Bergquist J, Ekman R, Tarkowski A. Catecholamines are synthesized by mouse lymphocytes and regulate function of these cells by induction of apoptosis. Immunology. 1996;88(1):140–6.
217. Thoppil J, Mehta P, Bartels B, Sharma D, Farrar JD. Impact of norepinephrine on immunity and oxidative metabolism in sepsis. Front Immunol. 2023;14.
218. Frasca D, Romero M, Diaz A, Alter-Wolf S, Ratliff M, Landin AM, et al. A molecular mechanism for TNF-α-mediated down-regulation of B cell responses 1. J Immunol. 2012;188(1):279–86.
219. Jin H, Romano G, Marshall C, Donaldson AE, Suon S, Iacovitti L. Tyrosine hydroxylase gene regulation in human neuronal progenitor cells does not depend on Nurr1 as in the murine and rat systems. J Cell Physiol. 2006;207(1):49–57.
220. Beucher L, Gabillard-Lefort C, Baris OR, Mialet-Perez J. Monoamine oxidases: A missing link between mitochondria and inflammation in chronic diseases ? Redox Biol. 2024;77.
221. Won W, Choi H-J, Yoo J-Y, Kim D, Young Kim T, Ju Y, et al. Inhibiting peripheral and central MAO-B ameliorates joint inflammation and cognitive impairment in rheumatoid arthritis. Exp Mol Med. 2022;54(8):1180–200.
222. Li P, Cook JA, Gilkeson GS, Luttrell LM, Wang L, Borg KT, et al. Increased expression of beta-arrestin 1 and 2 in murine models of rheumatoid arthritis: Isoform specific regulation of inflammation. Mol Immunol. 2011;49(1–2):64–74.
223. Cui D, Zhang L, Chen J, Zhu M, Hou L, Chen B, et al. Changes in regulatory B cells and their relationship with rheumatoid arthritis disease activity. Clin Exp Med. 2015;15(3):285–92.
224. Ma L, Liu B, Jiang Z, Jiang Y. Reduced numbers of regulatory B cells are negatively correlated with disease activity in patients with new-onset rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol. 2014;33(2):187–95.

7 Anhang

	n	M_{Rang}	Mdn.	IQA		n	M_{Rang}	Mdn.	IQA
Kontrolle	158	110,25	-0,17	14,23	**Kontrolle**	158	109,45	-0,17	14,23
Phen 1µM	32	113,88	-2,12	36,78	**Doxa 10nM**	28	98,54	-4,40	46,30
Phen 10µM	32	115,28	-1,36	31,27	**Doxa 100nM**	28	105,46	-3,51	45,12
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
Kontrolle	158	107,15	-0,17	14,23	**Doxa 100nM**	28	41,89	-3,51	45,12
Phen 1µM + Doxa 100nM	27	113,67	-0,48	44,05	**Phen 1µM + Doxa 100nM**	27	44,56	-0,48	44,05
Phen 10µM + Doxa 100nM	28	99,71	-3,65	46,46	**Phen 10µM + Doxa 100nM**	28	39,64	-3,65	46,46
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
Phen 1µM	32	29,69	-2,12	36,78	**Phen 10µM**	32	31,94	-1,36	31,27
Phen 1µM + Doxa 100nM	27	30,37	-0,48	44,05	**Phen 10µM + Doxa 100nM**	28	28,86	-3,65	46,46

Tabelle 19: Deskriptive Statistik der relativ zur Kontrolle angegebenen IL-6-Konzentrationen
Doxa= Doxazosin; IL= Interleukin; IQA= Interquartilsabstand; Mdn.= Median; M_{Rang}= Mittlerer Rang; n= Stichprobengröße; Phen= Phenylephrine

	n	M_{Rang}	Mdn.	IQA		n	M_{Rang}	Mdn.	IQA
Kontrolle	159	90,11	0,05	13,29	**Kontrolle**	159	101,22	0,05	13,29
Phen 1µM	32	147,31	17,68	38,07	**Doxa 10nM**	28	125,88	6,26	20,95
Phen 10µM	32	185,44	36,12	30,25	**Doxa 100nM**	28	128,63	4,88	22,14
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
Kontrolle	159	99,57	0,05	13,29	**Doxa 100nM**	28	38,14	4,88	22,14
Phen 1µM + Doxa 100nM	28	136,82	13,92	43,18	**Phen 1µM + Doxa 100nM**	28	46,14	13,92	43,18
Phen 10µM + Doxa 100nM	27	123,82	8,44	40,28	**Phen 10µM + Doxa 100nM**	27	41,70	8,44	40,28
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
Phen 1µM	32	31,66	17,68	38,07	**Phen 10µM**	32	37,88	36,12	30,25
Phen 1µM + Doxa 100nM	28	29,18	13,92	43,18	**Phen 10µM + Doxa 100nM**	27	20,67	8,44	40,28

Tabelle 20: Deskriptive Statistik der relativ zur Kontrolle angegebenen IL-10-Konzentrationen
Doxa= Doxazosin; IL= Interleukin; IQA= Interquartilsabstand; Mdn.= Median; M_{Rang}= Mittlerer Rang; n= Stichprobengröße; Phen= Phenylephrine

Im KW-Test und MWU-Test miteinander verglichenen Gruppen	Ergebnisse für die Vergleiche der IL-6-Konzentrationen	Ergebnisse für die Vergleiche der IL-10-Konzentrationen
Kontrolle Phen 1 µM Phen 10 µM	H(2)= 0,21; p= 0,900	H (2)= 69,34; p≤ 0,001
Kontrolle Doxa 10 nM Doxa 100 nM	H(2)= 0,77; p= 0,679	H(2)= 7,28; p= 0,026
Kontrolle Phen 1 µM + Doxa 100 nM Phen 10 µM + Doxa 100 nM	H(2)= 0,71; p= 0,702	H(2)= 10,75; p= 0,005
Phen 1 µM Phen 1 µM + Doxa 100 nM	U= 422,00; z= - 0,15; p= 0,886	U=411,00; z= 0,55; p= 0,591
Phen 10 µM Phen 10 µM + Doxa 100 nM	U= 402,00; z= 0,68; p= 0,503	U= 180,00; z= 3,83; p≤ 0,001; *r*= 0,50 [0,28; 0,67]
Doxa 100 nM Phen 1 µM + Doxa 100 nM Phen 10 µM + Doxa 100 nM	H(2)= 0,57; p= 0,751	H(2)= 1,55; p= 0,461

Tabelle 21: Durchgeführte KW-Tests und MWU-Tests und deren Ergebnisse
Doxa= Doxazosin; IL= Interleukin; KW-Test= Kruskal-Wallis-Test; MWU-Test= Mann-Whitney-U-Test; p= p-Wert; Phen= Phenylepinephrin; *r*= Pearson-Korrelationskoeffizient; *z*= z-Statistik

Gruppe 1	Gruppe 2	*z-Score*	p-Wert	*r*	95% KI (*r*)
Kontrolle	Phen 1µM	-4,58	<0,001	-0,33	-0,45; -0,20
Kontrolle	Phen 10µM	-7,63	<0,001	-0,55	-0,64; -0,45
Phen 1µM	Phen 10µM	-2,36	0,054	-	-
Kontrolle	Doxa 10nM	-1,93	0,159	-	-
Kontrolle	Doxa 100nM	-2,15	0,095	-	-
Doxa 10nM	Doxa 100nM	-0,17	>0,999	-	-
Kontrolle	Phen 1µM + Doxa 100nM	-2,94	0,010	-0,22	-0,35; -0,07
Kontrolle	Phen 10µM + Doxa 100nM	-1,88	0,181	-	-
Phen 1µM + Doxa 100nM	Phen 10µM + Doxa 100nM	0,78	>0,999	-	-

Tabelle 22: Paarweiser Vergleich der im signifikanten Kruskal-Wallis-Test für die IL-10-Konzentrationen eingesetzten Gruppen
Der p-Wert stellt den Bonferroni-korrigierten p-Wert für den paarweisen Vergleich dar.
Doxa= Doxazosin; IL= Interleukin; KI= Konfidenzintervall; Phen= Phenylephrine; *r*= Pearson-Korrelationskoeffizient

	n	M_{Rang}	Mdn.	IQA		n	M_{Rang}	Mdn.	IQA
Kontrolle	158	106,34	-0,17	14,23	**Kontrolle**	158	117,71	-0,17	14,23
Dex 100nM	29	113,83	-0,26	32,76	**RS 10nM**	29	103,36	-5,83	36,40
Dex 1µM	29	114,93	-1,61	47,23	**RS 100nM**	31	73,34	-14,35	17,94

Tabelle 23: Deskriptive Statistik der relativ zur Kontrolle angegebenen IL-6-Konzentrationen
Dex=Dexmedetomidine; IL= Interleukin; IQA= Interquartilsabstand; Mdn.= Median; M_{Rang}= Mittlerer Rang; n= Stichprobengröße; RS= RS-79948

	n	M_{Rang}	Mdn.	IQA		n	M_{Rang}	Mdn.	IQA
Kontrolle	159	101,86	0,05	13,29	**Kontrolle**	159	95,31	0,05	13,29
Dex 100nM	29	132,45	5,39	28,86	**RS 10nM**	29	153,52	17,41	24,27
Dex 1µM	29	124,72	8,62	37,37	**RS 100nM**	31	144,65	13,77	41,11

Tabelle 24: Deskriptive Statistik der relativ zur Kontrolle angegebenen IL-10-Konzentrationen
Dex=Dexmedetomidine; IL= Interleukin; IQA= Interquartilsabstand; Mdn.= Median; M_{Rang}= Mittlerer Rang; n= Stichprobengröße; RS= RS-79948

Im KW-Test miteinander verglichenen Gruppen	Ergebnisse für die Vergleiche der IL-6-Konzentrationen	Ergebnisse für die Vergleiche der IL-10-Konzentrationen
Kontrolle Dex 100 nM Dex 1 µM	H(2)= 0,71; p= 0,703	H(2)= 7,92; p= 0,019
Kontrolle RS 10 nM RS 100 nM	H(2)= 13,15; p= 0,001	H(2)= 31,49; p≤ 0,001

Tabelle 25: Durchgeführte KW-Tests und deren Ergebnisse
Dex= Dexmedetomidine; IL= Interleukin; KW-Test= Kruskal-Wallis-Test; p= p-Wert; RS= RS-79948

Gruppe 1	Gruppe 2	*z-Score*	p-Wert	*r*	95% KI (*r*)
Kontrolle	RS 10nM	12,74	0,779	-	-
Kontrolle	RS 100nM	3,58	0,001	0,26	0,12; 0,39
RS 10nM	RS 100nM	1,84	0,196	-	-

Tabelle 26: Paarweiser Vergleich der im signifikanten Kruskal-Wallis-Test für die IL-6-Konzentrationen eingesetzten Gruppen
Der p-Wert stellt den Bonferroni-korrigierten p-Wert für den paarweisen Vergleich dar.
KI= Konfidenzintervall; IL= Interleukin; *r*= Pearson-Korrelationskoeffizient; RS= RS-79948

Gruppe 1	Gruppe 2	*z-Score*	p-Wert	*r*	95% KI (*r*)
Kontrolle	Dex 100nM	-2,41	0,047	-0,18	-0,31; -0,03
Kontrolle	Dex 1µM	-1,80	0,214	-	-
Dex 100nM	Dex 1µM	0,47	>0,999	-	-
Kontrolle	RS 10nM	-4,55	<0,001	-0,33	-0,45; -0,20
Kontrolle	RS 100nM	-3,97	<0,001	-0,29	-0,41; -0,14
RS 10nM	RS 100nM	0,54	>0,999	-	-

Tabelle 27: Paarweiser Vergleich der im signifikanten Kruskal-Wallis-Test für die IL-10-Konzentrationen eingesetzten Gruppen

Der p-Wert stellt den Bonferroni-korrigierten p-Wert für den paarweisen Vergleich dar.
Dex= Dexmedetomidine; IL= Interleukin; KI= Konfidenzintervall; *r*= Pearson-Korrelationskoeffizient; RS= RS-79948

	n	M_{Rang}	Mdn.	IQA		n	M_{Rang}	Mdn.	IQA
Kontrolle	158	147,01	-0,17	14,23	**Kontrolle**	158	111,43	-0,17	14,23
Iso 1nM	28	173,91	3,51	22,30	**Nad 100nM**	32	119,25	0,77	37,69
Iso 10nM	31	136,63	-4,79	21,02	**Nad 1µM**	32	104,09	-3,69	39,65
Iso 100nM	31	149,68	-3,86	30,61					
Iso 1µM	31	172,98	15,88	44,10					
Iso 10µM	31	189,35	13,38	35,01					
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
Kontrolle	158	126,51	-0,17	14,23	**Nad 1µM**	32	63,19	-3,69	39,65
Iso 10nM + Nad 1µM	29	114,17	-8,57	41,69	**Iso 10nM + Nad 1µM**	29	56,14	-8,57	41,69
Iso 100nM + Nad 1µM	30	115,43	-5,31	49,06	**Iso 100nM + Nad 1µM**	30	57,80	-5,31	49,06
Iso 1µM + Nad 1µM	30	128,87	-0,39	35,08	**Iso 1µM + Nad 1µM**	30	66,57	-0,39	35,08
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
Iso 10nM	31	31,71	-4,79	21,02	**Iso 100nM**	31	33,19	-3,86	30,61
Iso 10nM + Nad 1µM	29	29,21	-8,57	41,69	**Iso 100nM + Nad 1µM**	30	28,73	-5,31	49,06
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**					
Iso 1µM	31	32,61	15,88	44,10					
Iso 1µM + Nad 1µM	30	29,33	-0,39	35,08					

Tabelle 28: Deskriptive Statistik der relativ zur Kontrolle angegebenen IL-6-Konzentrationen

IL= Interleukin; IQA= Interquartilsabstand; Iso= Isoproterenol; Mdn.= Median; M_{Rang}= Mittlerer Rang; n= Stichprobengröße; Nad= Nadolol

	n	M_{Rang}	Mdn.	IQA		n	M_{Rang}	Mdn.	IQA
Kontrolle	159	114,06	0,05	13,29	**Kontrolle**	159	98,22	0,05	13,29
Iso 1nM	28	187,36	12,52	37,15	**Nad 100nM**	32	146,39	19,60	45,21
Iso 10nM	31	182,69	9,74	35,70	**Nad 1µM**	32	146,08	12,68	32,26
Iso 100nM	31	212,35	25,63	48,55					
Iso 1µM	31	228,85	31,57	51,01					
Iso 10µM	31	186,89	14,97	38.98					
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
Kontrolle	159	123,89	0,05	13,29	**Nad 1µM**	32	72,06	12,68	32,26
Iso 10nM + Nad 1µM	29	124,95	-3,36	31,48	**Iso 10nM + Nad 1µM**	29	56,64	-3,36	31,48
Iso 100nM + Nad 1µM	30	127,05	-2,66	44,47	**Iso 100nM + Nad 1µM**	30	57,95	-2,66	44,47
Iso 1µM + Nad 1µM	30	124,73	0,75	46,28	**Iso 1µM + Nad 1µM**	30	56,47	0,75	46,28
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
Iso 10nM	31	35,06	9,74	35,70	**Iso 100nM**	31	37,52	25,63	48,55
Iso 10nM + Nad 1µM	29	25,62	-3,36	31,48	**Iso 100nM + Nad 1µM**	30	24,27	-2,66	44,47
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**					
Iso 1µM	31	38,84	31,57	51,01					
Iso 1µM + Nad 1µM	30	22,90	0,75	46,28					

Tabelle 29: Deskriptive Statistik der relativ zur Kontrolle angegebenen IL-10-Konzentrationen
IL= Interleukin; IQA= Interquartilsabstand; Iso= Isoproterenol; Mdn.= Median; M_{Rang}= Mittlerer Rang; n= Stichprobengröße; Nad= Nadolol

Im KW-Test und MWU-Test miteinander verglichenen Gruppen	Ergebnisse für die Vergleiche der IL-6-Konzentrationen	Ergebnisse für die Vergleiche der IL-10-Konzentrationen
Kontrolle Iso 1 nM Iso 10 nM Iso 100 nM Iso 1 µM Iso 10 µM	H(5)= 9,71; p= 0,084	H(5)= 76,91; p≤ 0,001
Kontrolle Nad 100 nM Nad 1 µM	H(2)= 0,89; p= 0,640	H(2)= 25,27; p≤ 0,001
Kontrolle Iso 10 nM + Nad 1 µM Iso 100 nM + Nad 1 µM Iso 1 µM + Nad 1 µM	H(3)= 1,31; p= 0,726	H(3)= 0,051; p= 0,997
Iso 10 nM Iso 10 nM + Nad 1 µM	U= 412,00; z= 0,56; p= 0,587	U= 308,00; z= 2,09; p= 0,036; *r*= 0,27 [0,02; 0,49]
Iso 100 nM Iso 100 nM + Nad 1 µM	U= 397,00; z= 0,98; p= 0,330	U= 263,00; z= 2,91; p= 0,003; *r*= 0,37 [0,13; 0,57]
Iso 1 µM Iso 1 µM + Nad 1 µM	U= 415,00; z= 0,72; p= 0,478	U= 222,00; z= 3,51; p≤ 0,001; *r*= 0,45 [0,22; 0,63]
Nad 1 µM Iso 10 nM + Nad 1 µM Iso 100 nM + Nad 1 µM Iso 1 µM + Nad 1 µM	H(3)= 1,69; p= 0,640	H(3)= 4,36; p= 0,225

Tabelle 30: Durchgeführten KW-Tests und MWU-Tests und deren Ergebnisse
IL= Interleukin; Iso= Isoproterenol; KW-Test= Kruskal-Wallis-Test; MWU-Test= Mann-Whitney-U-Test; Nad= Nadolol; p= p-Wert; *r*= Pearson-Korrelationskoeffizient; *z*= z-Statistik

Gruppe 1	Gruppe 2	*z-Score*	p-Wert	*r*	95% KI (*r*)
Kontrolle	Iso 1nM	-3,98	0,001	-0,29	-0,42; -0,15
Kontrolle	Iso 10nM	-3,89	0,002	-0,28	-0,41; -0,15
Kontrolle	Iso 100nM	-5,57	<0,001	-0,40	-0,52; -0,28
Kontrolle	Iso 1µM	-6,50	<0,001	-0,47	-0,58; -0,35
Kontrolle	Iso 10µM	-4,13	0,001	-0,30	-0,42; -0,17
Iso 1nM	Iso 10nM	0,20	>0,999	-	-
Iso 1nM	Iso 100nM	-1,07	>0,999	-	-
Iso 1nM	Iso 1µM	-1,77	>0,999	-	-
Iso 1nM	Iso 10µM	0,02	>0,999	-	-
Iso 10nM	Iso 100nM	-1,3	>0,999	-	-
Iso 10nM	Iso 1µM	-2,02	0,649	-	-
Iso 10nM	Iso 10µM	-0,18	>0,999	-	-
Iso 100nM	Iso 1µM	-0,77	>0,999	-	-
Iso 100nM	Iso 10µM	1,12	>0,999	-	-
Iso 1µM	Iso 10µM	1,84	0,992	-	-
Kontrolle	Nad 100nM	-3,85	<0,001	-0,28	-0,41; -0,14
Kontrolle	Nad 1µM	-3,83	<0,001	-0,28	-0,40; -0,14
Nad 100nM	Nad 1µM	0,02	>0,999	-	-

Tabelle 31: Paarweiser Vergleich der im signifikanten Kruskal-Wallis-Test für die IL-10-Konzentrationen eingesetzten Gruppen

Der p-Wert stellt den Bonferroni-korrigierten p-Wert für den paarweisen Vergleich dar.
IL= Interleukin; Iso= Isoproterenol; KI= Konfidenzintervall; Nad= Nadolol; *r*= Pearson-Korrelationskoeffizient

	n	M_{Rang}	Mdn.	IQA		n	M_{Rang}	Mdn.	IQA
Kontrolle	158	109,77	-0,17	14,23	**Kontrolle**	158	115,94	-0,17	14,23
Iso 10nM + Phen 1µM	28	129,29	3,22	31,99	**Iso 10nM + Phen 10µM**	28	130,36	9,56	53,34
Iso 100nM + Phen 1µM	28	152,25	12,70	47,36	**Iso 100nM + Phen 10µM**	28	140,50	9,51	41,57
Iso 1µM + Phen 1µM	28	149,14	13,04	40,05	**Iso 1µM + Phen 10µM**	28	125,04	1,50	32,33
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
Phen 1µM	32	51,13	-2,12	36,78	**Phen 10µM**	32	56,59	-1,36	31,27
Iso 10nM + Phen 1µM	28	54,32	3,22	31,99	**Iso 10nM + Phen 10µM**	28	58,82	9,56	53,34
Iso 100nM + Phen 1µM	28	65,11	12,70	47,36	**Iso 100nM + Phen 10µM**	28	62,46	9,51	41,57
Iso 1µM + Phen 1µM	28	64,50	13,04	40,05	**Iso 1µM + Phen 10µM**	28	56,39	1,50	32,33
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
Iso 10nM	31	39,90	-4,79	21,02	**Iso 100nM**	31	37,71	-3,86	3061
Iso 10nM + Phen 1µM	28	46,29	3,22	31,99	**Iso 100nM + Phen 1µM**	28	44,11	12,70	47,36
Iso 10nM + Phen 10µM	28	46,25	9,56	53,34	**Iso 100nM + Phen 10µM**	28	50,86	9,51	41,57
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**					
Iso 1µM	31	43,36	15,88	44,10					
Iso 1µM + Phen 1µM	28	39,93	13,04	40,05					
Iso 1µM + Phen 10µM	28	48,79	1,50	32,33					

Tabelle 32: Deskriptive Statistik der relativ zur Kontrolle angegebenen IL-6-Konzentrationen

IL= Interleukin; IQA= Interquartilsabstand; Iso= Isoproterenol; Mdn.= Median; M_{Rang}= Mittlerer Rang; n= Stichprobengröße; Phen= Phenylephrine

	n	M_{Rang}	Mdn.	IQA		n	M_{Rang}	Mdn.	IQA
Kontrolle	159	103,77	0,05	13,29	**Kontrolle**	159	107,41	0,05	13,29
Iso 10nM + Phen 1µM	28	159,11	23,49	46,89	**Iso 10nM + Phen 10µM**	28	152,04	13,83	48,13
Iso 100nM + Phen 1µM	28	157,46	20,99	44,76	**Iso 100nM + Phen 10µM**	29	157,17	18,44	57,98
Iso 1µM + Phen 1µM	28	152,96	13,51	40,93	**Iso 1µM + Phen 10µM**	29	146,28	20,20	68,50
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
Phen 1µM	32	59,28	17,68	38,07	**Phen 10µM**	32	71,91	36,12	30,25
Iso 10nM + Phen 1µM	28	60,75	23,49	46,89	**Iso 10nM + Phen 10µM**	28	52,86	13,83	48,13
Iso 100nM + Phen 1µM	28	59,61	20,99	44,76	**Iso 100nM + Phen 10µM**	29	57,21	18,44	57,98
Iso 1µM + Phen 1µM	28	54,25	13,51	40,93	**Iso 1µM + Phen 10µM**	29	54,52	20,20	68,50
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
Iso 10nM	31	41,84	9,74	35,7	**Iso 100nM**	31	47,45	25,63	48,55
Iso 10nM + Phen 1µM	28	46,04	23,49	46,89	**Iso 100nM + Phen 1µM**	29	41,79	20,99	44,76
Iso 10nM + Phen 10µM	28	44,36	13,83	48,13	**Iso 100nM + Phen 10µM**	28	43,97	18,44	57,98
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**					
Iso 1µM	31	52,42	31,57	51,01					
Iso 1µM + Phen 1µM	29	38,68	13,51	40,93					
Iso 1µM + Phen 10µM	28	41,66	20,20	68,50					

Tabelle 33: Deskriptive Statistik der relativ zur Kontrolle angegebenen IL-10-Konzentrationen
IL= Interleukin; IQA= Interquartilsabstand; Iso= Isoproterenol; Mdn.= Median; M_{Rang}= Mittlerer Rang; n= Stichprobengröße; Phen= Phenylephrine

Im KW-Test miteinander verglichenen Gruppen	Ergebnisse für die Vergleiche der IL-6-Konzentrationen	Ergebnisse für die Vergleiche der IL-10-Konzentrationen
Kontrolle Iso 10 nM + Phen 1 µM Iso 100 nM + Phen 1 µM Iso 1 µM + Phen 1 µM	H(3)= 14,55; p= 0,002	H(3)= 31,06; p≤ 0,001
Kontrolle Iso 10 nM + Phen 10 µM Iso 100 nM + Phen 10 µM Iso 1 µM + Phen 10 µM	H(3)= 3,58; p= 0,311	H(3)= 22,27; p≤ 0,001
Iso 10 nM Iso 10 nM + Phen 1 µM Iso 10 nM + Phen 10 µM	H(2)= 1,27; p= 0,531	H(2)= 0,41; p= 0,813
Iso 100 nM Iso 100 nM + Phen 1 µM Iso 100 nM + Phen 10 µM	H(2)= 3,99; p= 0,136	H(2)= 0,74; p= 0,690
Iso 1 µM Iso 1 µM + Phen 1 µM Iso 1 µM + Phen 10 µM	H(2)= 1,75; p= 0,416	H(2)= 4,97; p= 0,091
Phen 1 µM Iso 10 nM + Phen 1 µM Iso 100 nM + Phen 1 µM Iso 1 µM + Phen 1 µM	H(3)= 3,94; p= 0,268	H(3)= 0,62; p= 0,892
Phen 10 µM Iso 10 nM + Phen 10 µM Iso 100 nM + Phen 10 µM Iso 1 µM + Phen 10 µM	H(3)= 0,60; p= 0,895	H(3)= 6,01; p= 0,111

Tabelle 34: Durchgeführte KW-Tests und deren Ergebnisse
IL= Interleukin; Iso= Isoproterenol; KW-Test= Kruskal-Wallis-Test; p= p-Wert; Phen= Phenylepinephrin; *r*= Pearson-Korrelationskoeffizient; *z*= z-Statistik

Gruppe 1	Gruppe 2	*z-Score*	p-Wert	*r*	95% KI (*r*)
Kontrolle	Iso 10nM + Phen 1µM	-1,36	>0,999	-	-
Kontrolle	Iso 100nM + Phen 1µM	-2,96	0,018	-0,22	-0,35; -0,08
Kontrolle	Iso 1µM + Phen 1µM	-2,74	0,037	-0,20	-0,33; -0,06
Iso 10nM + Phen 1µM	Iso 100nM + Phen 1µM	-1,23	>0,999	-	-
Iso 10nM + Phen 1µM	Iso 1µM + Phen 1µM	-1,06	>0,999	-	-
Iso 100nM + Phen 1µM	Iso 1µM + Phen 1µM	0,17	>0,999	-	-

Tabelle 35: Paarweiser Vergleich der im signifikanten Kruskal-Wallis-Test für die IL-6-Konzentrationen eingesetzten Gruppen
Der p-Wert stellt den Bonferroni-korrigierten p-Wert für den paarweisen Vergleich dar.
IL= Interleukin Iso= Isoproterenol; KI= Konfidenzintervall; Phen= Phenylephrine; *r*= Pearson-Korrelationskoeffizient

Gruppe 1	Gruppe 2	*z-Score*	p-Wert	*r*	95% KI (*r*)
Kontrolle	Iso 10nM + Phen 1µM	-3,84	0,001	-0,28	-0,41; -0,14
Kontrolle	Iso 100nM + Phen 1µM	-3,73	0,001	-0,27	-0,40; -0,14
Kontrolle	Iso 1µM + Phen 1µM	-3,42	0,004	-0,25	-0,38; -0,11
Iso 10nM + Phen 1µM	Iso 100nM + Phen 1µM	0,09	>0,999	-	-
Iso 10nM + Phen 1µM	Iso 1µM + Phen 1µM	0,33	>0,999	-	-
Iso 100nM + Phen 1µM	Iso 1µM + Phen 1µM	0,24	>0,999	-	-
Kontrolle	Iso 10nM + Phen 10µM	-3,07	0,013	-0,23	-0,36; -0,08
Kontrolle	Iso 100nM + Phen 10µM	-3,48	0,003	-0,25	-0,38; -0,12
Kontrolle	Iso 1µM + Phen 10µM	-2,72	0,040	-0,20	-0,33; -0,06
Iso 10nM + Phen 10µM	Iso 100nM + Phen 10µM	-0,27	>0,999	-	-
Iso 10nM + Phen 10µM	Iso 1µM + Phen 10µM	0,31	>0,999	-	-
Iso 100nM + Phen 10µM	Iso 1µM + Phen 10µM	0,59	>0,999	-	-

Tabelle 36: Paarweiser Vergleich der im signifikanten Kruskal-Wallis-Test für die IL-10-Konzentrationen eingesetzten Gruppen

Der p-Wert stellt den Bonferroni-korrigierten p-Wert für den paarweisen Vergleich dar.
IL= Interleukin; Iso= Isoproterenol; KI= Konfidenzintervall; Phen= Phenylephrine; *r*= Pearson-Korrelationskoeffizient

	n	M_{Rang}	Mdn.	IQA		n	M_{Rang}	Mdn.	IQA
Kontrolle	158	113,60	-0,17	14,23	**Iso 1µM**	31	57,71	15,88	44,10
Iso 1µM + Doxa 100nM	29	123,74	6,76	57,71	**Iso 1µM + Doxa 100nM**	29	54,02	6,76	57,71
Iso 1µM + RS 100nM	28	116,96	-0,22	28,62	**Iso 1µM + RS 100nM**	28	51,20	-0,22	28,62
Iso 1µM + Doxa 100nM + RS 100nM	25	164,32	17,37	24,70	**Iso 1µM + Doxa 100nM + RS 100nM**	25	66,08	17,37	24,70
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
Doxa 100nM	28	36,75	-3,51	45,12	**RS 100nM**	31	29,42	-14,35	17,94
Iso 1µM + Doxa 100nM	29	40,45	6,76	57,71	**Iso 1µM + RS 100nM**	28	44,57	-0,22	28,62
Iso 1µM + Doxa 100nM + RS 100nM	25	48,04	17,37	24,70	**Iso 1µM + Doxa 100nM + RS 100nM**	25	56,40	17,37	24,70

Tabelle 37: Deskriptive Statistik der relativ zur Kontrolle angegebenen IL-6-Konzentrationen

Doxa= Doxazosin; IL= Interleukin; IQA= Interquartilsabstand; Iso= Isoproterenol; Mdn.= Median; M_{Rang}= Mittlerer Rang; n= Stichprobengröße; RS= RS-79948

	n	M_{Rang}	Mdn.	IQA		n	M_{Rang}	Mdn.	IQA
Kontrolle	159	94,19	0,05	13,29	**Iso 1µM**	31	64,13	31,57	51,01
Iso 1µM + Doxa 100nM	29	170,64	23,10	32,28	**Iso 1µM + Doxa 100nM**	29	52,95	23,10	32,28
Iso 1µM + RS 100nM	28	180,48	26,67	35,94	**Iso 1µM + RS 100nM**	28	61,48	26,67	35,94
Iso 1µM + Doxa 100nM + RS 100nM	28	175,43	25,61	22,88	**Iso 1µM + Doxa 100nM + RS 100nM**	28	55,04	25,61	22,88
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
Doxa 100nM	28	28,29	4,88	22,14	**RS 100nM**	31	38,36	13,77	41,11
Iso 1µM + Doxa 100nM	29	49,34	23,10	32,28	**Iso 1µM + RS 100nM**	28	49,75	26,67	35,94
Iso 1µM + Doxa 100nM + RS 100nM	28	51,14	25,61	22,88	**Iso 1µM + Doxa 100nM + RS 100nM**	28	44,50	25,61	22,88

Tabelle 38: Deskriptive Statistik der relativ zur Kontrolle angegebenen IL-10-Konzentrationen

Doxa= Doxazosin; IL= Interleukin; IQA= Interquartilsabstand; Iso= Isoproterenol; Mdn.= Median; M_{Rang}= Mittlerer Rang; n= Stichprobengröße; RS= RS-79948

Im KW-Test miteinander verglichenen Gruppen	Ergebnisse für die Vergleiche der IL-6-Konzentrationen	Ergebnisse für die Vergleiche der IL-10-Konzentrationen
Kontrolle **Iso 1 µM +Doxa 100 nM** **Iso 1 µM +RS 100 nM** **Iso 1 µM +Doxa 100 nM +RS 100 nM**	H(3)= 11,66; p= 0,009	H(3)= 73,71; p≤ 0,001
Iso 1 µM **Iso 1 µM +Doxa 100 nM** **Iso 1 µM +RS 100 nM** **Iso 1 µM +Doxa 100 nM +RS 100 nM**	H(3)= 30,50; p= 0,383	H(3)= 2,18; p= 0,537
Doxa 100 nM **Iso 1 µM +Doxa 100 nM** **Iso 1 µM +Doxa 100 nM +RS 100 nM**	H(2)= 3,06; p= 0,217	H(2)= 14,92; p≤ 0,001
RS 100 nM **Iso 1 µM +RS 100 nM** **Iso 1 µM + Doxa 100 nM + RS 100 nM**	H(2)= 17,24; p≤ 0,001	H(2)= 30,10; p= 0,222

Tabelle 39: Durchgeführte KW-Tests und deren Ergebnisse
Doxa= Doxazosin; IL= Interleukin; Iso= Isoproterenol; KW-Test= Kruskal-Wallis-Test; p= p-Wert; RS= RS-79948;

Gruppe 1	Gruppe 2	*z-Score*	p-Wert	*r*	95% KI (*r*)
Kontrolle	Iso 1µM +Doxa 100nM	-0,72	>0,999	-	-
Kontrolle	Iso 1µM +RS 100nM	-0,27	>0,999	-	-
Kontrolle	Iso 1µM +Doxa 100nM +RS 100nM	-3,39	0,003	-0,25	-0,38; -0,11
Iso 1µM +Doxa 100nM	Iso 1µM +Doxa 100nM +RS 100nM	-2,14	0,193	-	-
Iso 1µM +RS 100nM	Iso 1µM +Doxa 100nM +RS 100nM	-2,48	0,079	-	-
RS 100nM	Iso 1µM +RS 100nM	-2,38	0,052	-	-
RS 100nM	Iso 1µM +Doxa 100nM +RS 100nM	-4,12	<0,001	-0,55	-0,71; -0,34

Tabelle 40: Paarweiser Vergleich der im signifikanten Kruskal-Wallis-Test für die IL-6-Konzentrationen eingesetzten Gruppen
Der p-Wert stellt den Bonferroni-korrigierten p-Wert für den paarweisen Vergleich dar.
Doxa= Doxazosin; IL= Interleukin; Iso= Isoproterenol; KI= Konfidenzintervall; *r*= Pearson-Korrelationskoeffizient; RS= RS-79948

Gruppe 1	Gruppe 2	*z-Score*	p-Wert	*r*	95% KI (*r*)
Kontrolle	Iso 1µM +Doxa 100nM	-5,36	<0,001	-0,39	-0,51; -0,26
Kontrolle	Iso 1µM +RS 100nM	-5,97	<0,001	-0,44	-0,55; -0,31
Kontrolle	Iso 1µM +Doxa 100nM +RS 100nM	-5,62	<0,001	-0,41	-0,52; -0,28
Iso 1µM +Doxa 100nM	Iso 1µM +Doxa 100nM +RS 100nM	-0,26	>0,999	-	-
Iso 1µM +RS 100nM	Iso 1µM +Doxa 100nM +RS 100nM	0,27	>0,999	-	-
Doxa 100nM	Iso 1µM +Doxa 100nM	-3,22	0,004	-0,79	-0,87; -0,67
Doxa 100nM	Iso 1µM +Doxa 100nM +RS 100nM	-3,47	0,002	-0,72	-0,82; -0,56

Tabelle 41: Paarweiser Vergleich der im signifikanten Kruskal-Wallis-Test für die IL-10-Konzentrationen eingesetzten Gruppen.
Der p-Wert stellt den Bonferroni-korrigierten p-Wert für den paarweisen Vergleich dar.
Doxa= Doxazosin; IL= Interleukin; Iso= Isoproterenol; KI= Konfidenzintervall; *r*= Pearson-Korrelationskoeffizient; RS= RS-79948

	n	M_{Rang}	Mdn.	IQA		n	M_{Rang}	Mdn.	IQA
Kontrolle	158	152,80	-0,17	14,23	**Kontrolle**	158	103,07	-0,17	14,23
L 0,1nM	24	132,06	-5,93	14,96	**ICI 10nM**	22	101,46	-1,57	20,21
L 1nM	24	133,48	-4,26	14,39	**ICI 100nM**	22	90,27	-5,03	29,17
L 10nM	23	139,78	-4,84	21,25					
L 100nM	24	121,58	-5,53	9,22					
L 1µM	24	77,29	-15,35	25,70					
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
Kontrolle	158	95,65	-0,17	14,23	**ICI 10nM**	22	27,86	-1,57	20,21
Iso 10nM + ICI 10nM	17	138,77	20,34	48,29	**Iso 10nM + ICI 10nM**	17	44,94	20,34	48,29
Iso 100nM + ICI 10nM	20	148,70	19,81	38,05	**Iso 100nM + ICI 10nM**	20	48,00	19,81	38,05
Iso 1µM + ICI 10nM	20	138,75	12,39	24,85	**Iso 1µM + ICI 10nM**	20	41,15	12,39	24,85
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
Iso 10nM	31	21,42	-4,79	21,02	**Iso 100nM**	31	22,42	-3,86	30,61
Iso 10nM + ICI 10nM	17	30,12	20,34	48,29	**Iso 100nM + ICI 10nM**	20	31,55	19,81	38,05
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**					
Iso 1µM	31	25,00	15,88	44,10					
Iso 1µM + ICI 10nM	20	27,55	12,39	24,85					
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
Kontrolle	158	110,73	-0,17	14,23	**L 10nM**	23	40,78	-4,84	21,25
Iso 10nM + L 50nM	31	144,00	9,77	34,73	**Iso 10nM + L 50nM**	31	59,68	9,77	34,73
Iso 100nM + L 50nM	31	156,81	9,16	41,22	**Iso 100nM + L 50nM**	31	66,16	9,16	41,22
Iso 1µM + L 50nM	30	151,80	4,99	21,45	**Iso 1µM + L 50nM**	30	61,03	4,99	21,45
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
L 100nM	24	38,00	-5,53	9,22	**Iso 10nM**	31	27,61	-4,79	21,02
Iso 10nM + L 50nM	31	60,81	9,77	34,73	**Iso 10nM + L 50nM**	31	35,39	9,77	34,73
Iso 100nM + L 50nM	31	67,68	9,16	41,22					
Iso 1µM + L 50nM	30	63,03	4,99	21,45					
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
Iso 100nM	31	27,29	-3,86	3061	**Iso 1µM**	31	30,35	15,88	44,10
Iso 100nM + L 50nM	31	35,71	9,16	41,22	**Iso 1µM + L 50nM**	30	31,67	4,99	21,45

Tabelle 42: Deskriptive Statistik der relativ zur Kontrolle angegebenen IL-6-Konzentrationen
ICI= ICI-118,551; IL= Interleukin; Iso= Isoproterenol; IQA= Interquartilsabstand; L= L-748,337; Mdn.= Median; M_{Rang}= Mittlerer Rang; n= Stichprobengröße

	n	M_{Rang}	Mdn.	IQA		n	M_{Rang}	Mdn.	IQA
Kontrolle	159	125,73	0,05	13,29	**Kontrolle**	159	101,58	0,049	13,29
L 0,1nM	24	178,50	10,09	17,23	**ICI 10nM**	22	112,27	5,85	18,03
L 1nM	24	165,29	6,91	22,97	**ICI 100nM**	22	94,77	1,26	20,34
L 10nM	24	176,58	9,11	17,85					
L 100nM	24	156,04	5,40	18,48					
L 1µM	24	118,13	-2,44	27,25					
	n	M_{Rang}	**Mdn.**	**IQA**		**n**	M_{Rang}	**Mdn.**	**IQA**
Kontrolle	159	88,93	0,05	13,29	**ICI 10nM**	22	24,14	5,85	18,03
Iso 10nM + ICI 10nM	18	162,56	18,35	14,45	**Iso 10nM + ICI 10nM**	18	45,94	18,35	14,45
Iso 100nM + ICI 10nM	20	157,50	16,95	28,52	**Iso 100nM + ICI 10nM**	20	46,25	16,95	28,52
Iso 1µM + ICI 10nM	20	171,90	17,28	13,46	**Iso 1µM + ICI 10nM**	20	47,85	17,28	13,46
	n	M_{Rang}	**Mdn.**	**IQA**		**n**	M_{Rang}	**Mdn.**	**IQA**
Iso 10nM	31	23,55	9,74	35,70	**Iso 100nM**	31	26,81	25,63	48,55
Iso 10nM + ICI 10nM	18	27,50	18,35	14,45	**Iso 100nM + ICI 10nM**	20	24,75	16,95	28,52
	n	M_{Rang}	**Mdn.**	**IQA**					
Iso 1µM	31	28,68	31,57	51,01					
Iso 1µM + ICI 10nM	20	21,85	17,28	13,46					
	n	M_{Rang}	**Mdn.**	**IQA**		**n**	M_{Rang}	**Mdn.**	**IQA**
Kontrolle	159	116,49	0,05	13,29	**L 10nM**	24	62,29	9,11	17,85
Iso 10nM + L 50nM	31	148,82	3,47	29,76	**Iso 10nM + L 50nM**	31	60,47	3,47	29,76
Iso 100nM + L 50nM	31	151,40	9,31	34,94	**Iso 100nM + L 50nM**	31	61,73	9,31	34,94
Iso 1µM + L 50nM	31	130,61	2,59	24,43	**Iso 1µM + L 50nM**	31	52,26	2,59	24,43
	n	M_{Rang}	**Mdn.**	**IQA**		**n**	M_{Rang}	**Mdn.**	**IQA**
L 100nM	24	56,92	5,40	18,48	**Iso 10nM**	31	34,55	9,74	35,70
Iso 10nM + L 50nM	31	61,40	3,47	29,76	**Iso 10nM + L 50nM**	31	28,45	3,47	29,76
Iso 100nM + L 50nM	31	63,15	9,31	34,94					
Iso 1µM + L 50nM	31	54,07	2,59	24,43					
	n	M_{Rang}	**Mdn.**	**IQA**		**n**	M_{Rang}	**Mdn.**	**IQA**
Iso 100nM	31	37,68	25,63	48,55	**Iso 1µM**	31	40,48	31,57	51,01
Iso 100nM + L 50nM	31	25,32	9,31	34,94	**Iso 1µM + L 50nM**	31	22,52	2,59	24,43

Tabelle 43: Deskriptive Statistik der relativ zur Kontrolle angegebenen IL-10-Konzentrationen
ICI= ICI-118,551; IL= Interleukin; IQA= Interquartilsabstand; Iso= Isoproterenol; L= L-748,337; Mdn.= Median; M_{Rang}= Mittlerer Rang; n= Stichprobengröße

Im KW-Test und MWU-Test miteinander verglichenen Gruppen	Ergebnisse für die Vergleiche der IL-6-Konzentrationen	Ergebnisse für die Vergleiche der IL-10-Konzentrationen
Kontrolle **ICI 10 nM** **ICI 100 nM**	H(2)= 0,93; p= 0,630	H(2)= 1,01; p= 0,602
Kontrolle **L 0,1 nM** **L 1 nM** **L 10 nM** **L 100 nM** **L 1 µM**	H(5)= 20,36; p= 0,001	H(5)= 20,44; p= 0,001
Kontrolle **Iso 10 nM + ICI 10 nM** **Iso 100 nM + ICI 10 nM** **Iso 1 µM + ICI 10 nM**	H(3)= 23,84; p≤ 0,001	H(3)= 61,36; p≤ 0,001
ICI 10 nM **Iso 10 nM + ICI 10 nM** **Iso 100 nM + ICI 10 nM** **Iso 1 µM + ICI 10 nM**	H(3)= 9,42; p= 0,024	H(3)= 15,12; p= 0,002
Iso 10 nM **Iso 10 nM + ICI 10 nM**	U= 1,00; z= - 2,06; p= 0,040; *r*= - 0,30 [- 0,54; - 0,01]	U= 234,00; z= - 0,93; p= 0,360
Iso 100 nM **Iso 100 nM + ICI 10 nM**	U= 199,00; z= - 2,14; p= 0,032; *r*= - 0,30 [- 0,53; - 0,03]	U= 285,00; z= 0,48; p= 0,639
Iso 1 µM **Iso 1 µM + ICI 10 nM**	U= 179,00; z= - 0,60; p= 0,560	U= 227,00; z= 1,60; p= 0,112
Kontrolle **Iso 10 nM + L 50 nM** **Iso 100 nM + L 50 nM** **Iso 1 µM + L 50 nM**	H(3)= 18,40; p≤ 0,001	H(3)= 9,62; p= 0,022
L 10 nM **Iso 10 nM + L 50 nM** **Iso 100 nM + L 50 nM** **Iso 1 µM + L 50 nM**	H(3)= 8,32; p= 0,040	H(3)= 1,71; p= 0,635
L 100 nM **Iso 10 nM + L 50 nM** **Iso 100 nM + L 50 nM** **Iso 1 µM + L 50 nM**	H(3)= 11,92; p= 0,008	H(3)= 1,37; p= 0,714
Iso 10 nM **Iso 10 nM + L 50 nM**	U= 360,00; z= - 1,70; p= 0,091	U= 386,00; z= 1,33; p= 0,187
Iso 100 nM **Iso 100 nM + L 50 nM**	U= 350,00; z= - 1,84; p= 0,067	U= 289,00; z= 2,70; p= 0,007; *r*= 0,34 [0,10; 0,55]
Iso 1 µM **Iso 1 µM + L 50 nM**	U= 445,00; z= - 0,29; p= 0,777	U= 202,00; z= 3,92; p≤ 0,001; *r*= 0,50; [0,28; 0,67]

Tabelle 44: Durchgeführte KW-Tests und MWU-Tests und deren Ergebnisse
ICI= ICI-118,551; IL= Interleukin; Iso= Isoproterenol; KW-Test= Kruskal-Wallis-Test; L= L-748,337; MWU-Test= Mann-Whitney-U-Test; p= p-Wert; *r*= Pearson-Korrelationskoeffizient; *z*= z-Statistik

Gruppe 1	Gruppe 2	*z-Score*	p-Wert	*r*	95% KI (*r*)
Kontrolle	L 0,1nM	1,18	>0,999	-	-
Kontrolle	L 1nM	1,10	>0,999	-	-
Kontrolle	L 10nM	0,73	>0,999	-	-
Kontrolle	L 100nM	1,78	>0,999	-	-
Kontrolle	L 1µM	4,30	<0,001	0,32	0,18; 0,44
L 0,1nM	L 1nM	-0,06	>0,999	-	-
L 0,1nM	L 10nM	-0,33	>0,999	-	-
L 0,1nM	L 100nM	0,45	>0,999	-	-
L 0,1nM	L 1µM	2,37	0,268	-	-
L 1nM	L 10nM	-0,27	>0,999	-	-
L 1nM	L 100nM	0,78	>0,999	-	-
L 1nM	L 1µM	2,43	0,227	-	-
L 10nM	L 100nM	0,78	>0,999	-	-
L 10nM	L 1µM	2,67	0,113	-	-
L 100nM	L 1µM	1,92	0,832	-	-
Kontrolle	Iso 10nM + ICI 10nM	-2,72	0,040	-0,21	-0,34; -0,06
Kontrolle	Iso 100nM + ICI 10nM	-3,59	0,002	-0,27	-0,40; -0,13
Kontrolle	Iso 1µM + ICI 10nM	-2,02	0,021	-0,15	-0,29; -0,004
Iso 10nM + ICI 10nM	Iso 100nM + ICI 10nM	-0,48	>0,999	-	-
Iso 10nM + ICI 10nM	Iso 1µM + ICI 10nM	0,001	>0,999	-	-
Iso 100nM + ICI 10nM	Iso 1µM + ICI 10nM	0,51	>0,999	-	-
ICI 10nM	Iso 10nM + ICI 10nM	-2,30	0,127	-	-
ICI 10nM	Iso 100nM + ICI 10nM	-2,84	0,027	-0,44	-0,66; -0,16
ICI 10nM	Iso 1µM + ICI 10nM	-1,87	0,366	-	-
Kontrolle	Iso 10nM + L 50nM	-2,34	0,115	-	-
Kontrolle	Iso 100nM + L 50nM	-3,24	0,007	-0,24	-0,37; -0,10-
Kontrolle	Iso 1µM + L 50nM	-2,85	0,026	-0,21	-0,34; -0,07
Iso 10nM + L 50nM	Iso 100nM + L 50nM	-0,70	>0,999	-	-
Iso 10nM + L 50nM	Iso 1µM + L 50nM	-0,42	>0,999	-	-
Iso 100nM + L 50nM	Iso 1µM + L 50nM	0,27	>0,999	-	-
L 10nM	Iso 10nM + L 50nM	-2,06	0,237	-	-
L 10nM	Iso 100nM + L 50nM	-2,77	0,034	-0,38	-0,59; -0,12
L 10nM	Iso 1µM + L 50nM	-2,19	0,170	-	-
L 100nM	Iso 10nM + L 50nM	-2,50	0,076	-	-
L 100nM	Iso 100nM + L 50nM	-3,25	0,007	-0,44	-0,63; -0,20
L 100nM	Iso 1µM + L 50nM	-2,72	0,039	-0,37	-0,58; -0,11

Tabelle 45: Paarweiser Vergleich der im signifikanten Kruskal-Wallis-Test für die IL-6-Konzentrationen eingesetzten Gruppen

Der p-Wert stellt den Bonferroni-korrigierten p-Wert für den paarweisen Vergleich dar.
ICI= ICI-118,551; IL= Interleukin; Iso= Isoproterenol; KI= Konfidenzintervall; L=L-748,337; *r*= Pearson-Korrelationskoeffizient

Gruppe 1	Gruppe 2	*z-Score*	p-Wert	*r*	95% KI (*r*)
Kontrolle	L 0,1nM	-2,99	0,042	-0,22	-0,36; -0,08
Kontrolle	L 1nM	-2,24	0,377	-	-
Kontrolle	L 10nM	-2,89	0,060	-	-
Kontrolle	L 100nM	-1,72	>0,999	-	-
Kontrolle	L 1µM	0,43	>0,999	-	-
L 0,1nM	L 1nM	0,57	>0,999	-	-
L 0,1nM	L 10nM	0,08	>0,999	-	-
L 0,1nM	L 100nM	0,96	>0,999	-	-
L 0,1nM	L 1µM	2,59	0,143	-	-
L 1nM	L 10nM	-0,49	>0,999	-	-
L 1nM	L 100nM	0,40	>0,999	-	-
L 1nM	L 1µM	2,03	0,643	-	-
L 10nM	L 100nM	0,88	>0,999	-	-
L 10nM	L 1µM	2,51	0,181	-	-
L 100nM	L 1µM	1,63	>0,999	-	-
Kontrolle	Iso 10nM + ICI 10nM	-4,72	<0,001	-0,36	-0,48; -0,22
Kontrolle	Iso 100nM + ICI 10nM	-4,60	<0,001	-0,34	-0,47; -0,21
Kontrolle	Iso 1µM + ICI 10nM	-5,57	<0,001	-0,42	-0,53; -0,29
Iso 10nM + ICI 10nM	Iso 100nM + ICI 10nM	0,25	>0,999	-	-
Iso 10nM + ICI 10nM	Iso 1µM + ICI 10nM	-0,46	>0,999	-	-
Iso 100nM + ICI 10nM	Iso 1µM + ICI 10nM	-0,73	>0,999	-	-
ICI 10nM	Iso 10nM + ICI 10nM	-2,95	0,019	-0,46	-0,67; -0,18
ICI 10nM	Iso 100nM + ICI 10nM	-3,08	0,012	-0,46	-0,67; -0,19
ICI 10nM	Iso 1µM + ICI 10nM	-3,30	0,006	-0,50	-0,69; -0,24
Kontrolle	Iso 10nM + L 50nM	-2,26	0,143	-	-
Kontrolle	Iso 100nM + L 50nM	-2,44	0,088	-	-
Kontrolle	Iso 1µM + L 50nM	-0,99	>0,999	-	-
Iso 10nM + L 50nM	Iso 100nM + L 50nM	-1,12	>0,999	-	-
Iso 10nM + L 50nM	Iso 1µM + L 50nM	0,98	>0,999	-	-
Iso 100nM + L 50nM	Iso 1µM + L 50nM	0,14	>0,999	-	-

Tabelle 46: Paarweiser Vergleich der im signifikanten Kruskal-Wallis-Test für die IL-10-Konzentrationen eingesetzten Gruppen

Der p-Wert stellt den Bonferroni-korrigierten p-Wert für den paarweisen Vergleich dar.
ICI= ICI-118,551; IL= Interleukin; Iso= Isoproterenol; KI= Konfidenzintervall; L=L-748,337; *r*= Pearson-Korrelationskoeffizient

	n	M_{Rang}	Mdn.	IQA		n	M_{Rang}	Mdn.	IQA
Kontrolle	158	157,69	-0,17	14,23	**Kontrolle**	158	101,80	-0,17	14,23
BRL 0,1nM	24	112,83	-9,70	18,56	**BRL 10nM + ICI 10nM**	20	136,35	15,01	28,21
BRL 1nM	24	122,71	-8,04	16,52	**BRL100nM + ICI 10nM**	20	124,20	10,65	31,01
BRL 10nM	24	114,58	-9,78	19,45	**BRL 1µM + ICI 10nM**	20	128,75	7,79	29,05
BRL 100nM	24	118.67	-6,78	14,59					
BRL 1µM	24	108,96	-8,70	24,17					
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
ICI 10nM	22	33,05	-1,57	20,21	**BRL 10nM**	24	17,38	-9,78	19,45
BRL 10nM + ICI 10nM	20	48,05	15,01	28,21	**BRL 10nM + ICI 10nM**	20	28,65	15,01	28,21
BRL 100nM + ICI 10nM	20	42,45	10,65	31,01					
BRL 1µM + ICI 10nM	20	43,30	7,79	29,05					
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
BRL 100nM	24	18,17	-6,78	14,59	**BRL 1µM**	24	17,38	-8,70	24,17
BRL 100nM + ICI 10nM	20	27,70	10,65	31,01	**BRL 1µM + ICI 10nM**	20	28,65	7,79	29,05
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
Kontrolle	158	119,72	-0,17	14,23	**L 10nM**	23	49,65	-4,84	21,25
BRL 10nM + L 50nM	31	142,58	5,97	38,92	**BRL 10nM + L 50nM**	31	63,90	5,97	38,92
BRL 100nM + L 50nM	31	136,16	5,71	39,75	**BRL100nM + L 50nM**	31	60,90	5,71	39,75
BRL 1µM + L 50nM	31	131,26	6,33	36,30	**BRL 1µM + L 50nM**	31	57,26	6,33	36,30
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
L 100nM	24	46,83	-5,53	9,22	**BRL 10nM**	24	22,00	-9,78	19,45
BRL 10nM + L 50nM	31	65,36	5,97	38,92	**BRL 10nM + L 50nM**	31	31,65	5,97	38,92
BRL 100nM + L 50nM	31	62,61	5,71	39,75					
BRL1µM + L 50nM	31	58,45	6,33	36,30					
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
BRL 100nM	24	23,21	-6,78	14,59	**BRL 1µM**	24	22,88	-8,70	24,17
BRL 100nM + L 50nM	31	31,71	5,71	39,75	**BRL 1µM + L 50nM**	31	31,97	6,33	36,30

Tabelle 47: Deskriptive Statistik der relativ zur Kontrolle angegebenen IL-6-Konzentrationen
BRL= BRL-37344; ICI= ICI-118,551; IL= Interleukin; IQA= Interquartilsabstand; L= 748,337; Mdn.= Median; M_{Rang}= Mittlerer Rang; n= Stichprobengröße

	n	M_{Rang}	Mdn.	IQA		n	M_{Rang}	Mdn.	IQA
Kontrolle	159	123,59	0,049	13,29	**Kontrolle**	159	95,98	-0,17	14,23
BRL 0,1nM	24	143,33	4,47	16,54	**BRL 10nM + ICI 10nM**	20	151,90	15,51	19,59
BRL 1nM	24	164,25	4,55	20,02	**BRL100nM + ICI 10nM**	20	146,80	7,30	21,49
BRL 10nM	24	151,15	3,07	13,70	**BRL 1µM + ICI 10nM**	20	142,80	11,83	22,30
BRL 100nM	24	170,04	5,25	14,06					
BRL 1µM	24	179,04	8,11	16,29					
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
ICI 10nM	22	31,59	5,85	18,03	**BRL 10nM**	24	18,96	3,07	13,70
BRL 10nM + ICI 10nM	20	48,00	15,51	19,59	**BRL 10nM + ICI 10nM**	20	26,75	15,51	19,59
BRL 100nM + ICI 10nM	20	43,85	7,30	21,49					
BRL 1µM + ICI 10nM	20	43,55	11,83	22,30					
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
BRL 100nM	24	21,17	5,25	14,06	**BRL 1µM**	24	21,67	8,11	16,29
BRL 100nM + ICI 10nM	20	24,10	7,30	21,49	**BRL 1µM + ICI 10nM**	20	23,50	11,83	22,30
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
Kontrolle	159	121,68	-0,17	14,23	**L 10nM**	24	69,25	9,11	17,85
BRL 10nM + L 50nM	31	154,61	6,74	16,44	**BRL 10nM + L 50nM**	31	63,81	6,74	16,44
BRL 100nM + L 50nM	31	129,07	4,79	35,48	**BRL100nM + L 50nM**	31	55,26	4,79	35,48
BRL 1µM + L 50nM	31	120,55	1,56	20,73	**BRL 1µM + L 50nM**	31	50,00	1,56	20,73
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
L 100nM	24	62,58	5,40	18,48	**BRL 10nM**	24	26,63	3,07	13,70
BRL 10nM + L 50nM	31	65,48	6,74	16,44	**BRL 10nM + L 50nM**	31	29,07	6,74	16,44
BRL 100nM + L 50nM	31	57,23	4,79	35,48					
BRL1µM + L 50nM	31	51,52	1,56	20,73					
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
BRL 100nM	24	30,71	5,25	14,06	**BRL 1µM**	24	33,50	8,11	16,29
BRL 100nM + L 50nM	31	25,90	4,79	35,48	**BRL 1µM + L 50nM**	31	23,74	1,56	20,73

Tabelle 48: Deskriptive Statistik der relativ zur Kontrolle angegebenen IL-10-Konzentrationen
BRL= BRL-37344; ICI= ICI-118,551; IL= Interleukin; IQA= Interquartilsabstand; L= 748,337; Mdn.= Median; M_{Rang}= Mittlerer Rang; n= Stichprobengröße

Im KW-Test und MWU-Test miteinander verglichenen Gruppen	Ergebnisse für die Vergleiche der IL-6-Konzentrationen	Ergebnisse für die Vergleiche der IL-10-Konzentrationen
Kontrolle BRL 0,1 nM BRL 1 nM BRL 10 nM BRL 100 nM BRL 1 µM	H(5)= 19,16; p= 0,002	H(5)= 18,39; p= 0,002
Kontrolle BRL 10 nM + ICI 10 nM BRL 100 nM + ICI 10 nM BRL 1 µM + ICI 10 nM	H(3)= 8,93; p= 0,030	H(3)= 28,64; p≤ 0,001
ICI 10 nM BRL 10 nM + ICI 10 nM BRL 100 nM + ICI 10 nM BRL 1 µM + ICI 10 nM	H(3)= 4,43; p= 0,218	H(3)= 5,64; p= 0,130
BRL 10 nM BRL 10 nM + ICI 10 nM	U= 117,00; z= - 2,90; p= 0,003; *r*= - 0,44 [- 0,65; - 0,16]	U= 115,00; z= - 2,00; p= 0,046; *r*= - 0,30 [- 0,55; - 0,01]
BRL100 nM BRL 100 nM + ICI 10 nM	U= 136,00; z= - 2,45; p= 0,014; *r*= - 0,37 [- 0,60; - 0,08]	U= 208,00; z= - 0,75; p= 0,462
BRL 1 µM BRL 1 µM + ICI 10 nM	U= 117,00; z= - 2,90; p= 0,003; *r*= - 0,44 [- 0,65; - 0,16]	U= 220,00; z= - 0,47; p= 0,649
Kontrolle BRL 10 nM + L 50 nM BRL 100 nM + L 50 nM BRL 1 µM + L 50 nM	H(3)= 3,57; p= 0,312	H(3)= 5,55; p= 0,136
L 10 nM BRL 10 nM + L 50 nM BRL 100 nM + L 50 nM BRL 1 µM + L 50 nM	H(3)= 2,59; p= 0,459	H(3)= H(3)= 5,37; p= 0,146
L 100 nM BRL 10 nM + L 50 nM BRL 100 nM + L 50 nM BRL 1 µM + L 50 nM	H(3)= 4,54; p= 0,209	H(3)= H(3)= 3,00; p= 0,392
BRL 10 nM BRL 10 nM + L 50 nM	U= 228,00; z= - 2,44; p= 0,014; *r*= - 0,33 [- 0,55; - 0,07]	U= 339,00; z= - 0,56; p= 0,584
BRL 100 nM BRL 100 nM + L 50 nM	U= 257,00; z= - 1,95; p= 0,051	U= 307,00; z= 1,10; p= 0,276
BRL 1 µM BRL 1 µM + L 50 nM	U= 249,00; z= - 2,09; p= 0,037; *r*= - 0, 28 [- 0,51; - 0,02])	U= 240,00; z= 2,24; p= 0,025; *r*= 0,30 [0,04; 0,53]

Tabelle 49: Durchgeführte KW-Tests und MWU-Tests und deren Ergebnisse
BRL= BRL-37344; ICI= ICI-118,551; IL= Interleukin; KW-Test= Kruskal-Wallis-Test; L= L-748,337; MWU-Test= Mann-Whitney-U-Test; p= p-Wert; *r*= Pearson-Korrelationskoeffizient; *z*= z-Statistik

Gruppe 1	Gruppe 2	*z-Score*	p-Wert	*r*	95% KI (*r*)
Kontrolle	BRL 0,1nM	2,55	0,163	-	-
Kontrolle	BRL 1nM	1,99	0,705	-	-
Kontrolle	BRL 10nM	2,45	0,216	-	-
Kontrolle	BRL 100nM	2,22	0,401	-	-
Kontrolle	BRL 1µM	2,77	0,085	-	-
BRL 0,1nM	BRL 1nM	-0,43	>0,999	-	-
BRL 0,1nM	BRL 10nM	-0,08	>0,999	-	-
BRL 0,1nM	BRL 100nM	-0,25	>0,999	-	-
BRL 0,1nM	BRL 1µM	0,17	>0,999	-	-
BRL 1nM	BRL 10nM	0,35	>0,999	-	-
BRL 1nM	BRL 100nM	0,17	>0,999	-	-
BRL 1nM	BRL 1µM	0,59	>0,999	-	-
BRL 10nM	BRL 100nM	-0,18	>0,999	-	-
BRL 10nM	BRL 1µM	0,24	>0,999	-	-
BRL 100nM	BRL 1µM	0,42	>0,999	-	-
Kontrolle	BRL 10nM + ICI 10nM	-2,31	0,126	-	-
Kontrolle	BRL100nM + ICI 10nM	-1,50	0,808	-	-
Kontrolle	BRL 1µM + ICI 10nM	-1,80	0,431	-	-
BRL 10nM + ICI 10nM	BRL100nM + ICI 10nM	0,61	>0,999	-	-
BRL 10nM + ICI 10nM	BRL 1µM + ICI 10nM	0,38	>0,999	-	-
BRL100nM + ICI 10nM	BRL 1µM + ICI 10nM	-0,23	>0,999	-	-

Tabelle 50: Paarweiser Vergleich der im signifikanten Kruskal-Wallis-Test für die IL-6-Konzentrationen eingesetzten Gruppen

Der p-Wert stellt den Bonferroni-korrigierten p-Wert für den paarweisen Vergleich dar.
BRL= BRL-37344; ICI= ICI-118,551; IL= Interleukin; KI= Konfidenzintervall; *r*= Pearson-Korrelationskoeffizient

Gruppe 1	Gruppe 2	*z-Score*	p-Wert	*r*	95% KI (*r*)
Kontrolle	BRL 0,1nM	-1,12	>0,999	-	-
Kontrolle	BRL 1nM	-2,30	0,321	-	-
Kontrolle	BRL 10nM	-1,56	>0,999	-	-
Kontrolle	BRL 100nM	-2,68	0,111	-	-
Kontrolle	BRL 1µM	-3,14	0,025	-0,23	-0,37; -0,09
BRL 0,1nM	BRL 1nM	-0,90	>0,999	-	-
BRL 0,1nM	BRL 10nM	-0,34	>0,999	-	-
BRL 0,1nM	BRL 100nM	-1,19	>0,999	-	-
BRL 0,1nM	BRL 1µM	-1,53	>0,999	-	-
BRL 1nM	BRL 10nM	0,56	>0,999	-	-
BRL 1nM	BRL 100nM	-0,29	>0,999	-	-
BRL 1nM	BRL 1µM	-0,64	>0,999	-	-
BRL 10nM	BRL 100nM	-0,85	>0,999	-	-
BRL 10nM	BRL 1µM	-1,20	>0,999	-	-
BRL 100nM	BRL 1µM	-0,35	>0,999	-	-
Kontrolle	BRL 10nM + ICI 10nM	-3,72	0,001	-0,28	-0,41; -0,14
Kontrolle	BRL100nM + ICI 10nM	-3,38	0,004	-0,25	-0,39; -0,11
Kontrolle	BRL 1µM + ICI 10nM	-3.12	0,011	-0,23	-0,37; -0,09
BRL 10nM + ICI 10nM	BRL100nM + ICI 10nM	0,26	>0,999	-	-
BRL 10nM + ICI 10nM	BRL 1µM + ICI 10nM	0,45	>0,999	-	-
BRL100nM + ICI 10nM	BRL 1µM + ICI 10nM	0,20	>0,999	-	-

Tabelle 51: Paarweiser Vergleich der im signifikanten Kruskal-Wallis-Test für die IL-10-Konzentrationen eingesetzten Gruppen

Der p-Wert stellt den Bonferroni-korrigierten p-Wert für den paarweisen Vergleich dar.
BRL= BRL-37344; ICI= ICI-118,551; IL= Interleukin; KI= Konfidenzintervall; *r*= Pearson-Korrelationskoeffizient

	n	M_{Rang}	Mdn.	IQA		n	M_{Rang}	Mdn.	IQA
Kontrolle	158	154,87	-0,17	14,23	**Kontrolle**	158	103,32	-0,17	14,23
CL 0,1nM	23	118,00	-5,59	30,34	**CL 10nM + ICI 10nM**	20	130,45	11,79	46,09
CL 1nM	23	108,00	-10,32	20,99	**CL100nM + ICI 10nM**	20	117,90	1,71	47,12
CL 10nM	23	124,65	-9,62	16,94	**CL 1µM + ICI 10nM**	20	128,95	8,41	30,25
CL 100nM	24	132,29	-5,54	27,29					
CL 1µM	25	93,38	-11,66	16,63					
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
ICI 10nM	22	35,27	-1,57	20,21	**CL 10nM**	23	18,13	-9,62	16,94
CL 10nM + ICI 10nM	20	45,55	11,79	46,09	**CL 10nM + ICI 10nM**	20	26,45	11,79	46,09
CL 100nM + ICI 10nM	20	42,10	1,71	47,12					
CL 1µM + ICI 10nM	20	43,70	8,41	30,25					
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
CL 100nM	24	20,17	-5,54	27,29	**CL 1µM**	24	17,38	-11,66	16,63
CL 100nM + ICI 10nM	20	25,30	1,71	47,12	**CL 1µM + ICI 10nM**	20	28,65	8,41	30,25
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
Kontrolle	158	129,38	-0,17	14,23	**L 10nM**	23	59,87	-4,84	21,25
CL 10nM + L 50nM	31	132,29	0,28	29,62	**CL 10nM + L 50nM**	31	63,26	0,28	29,62
CL 100nM + L 50nM	31	133,84	2,98	36,43	**CL100nM + L 50nM**	31	63,10	2,98	36,43
CL 1µM + L 50nM	31	94,65	-12,96	30,78	**CL 1µM + L 50nM**	31	48,13	-12,96	30,78
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
L 100nM	24	56,83	-5,53	9,22	**CL 10nM**	23	25,22	-9,62	16,94
CL 10nM + L 50nM	31	64,87	0,28	29,62	**CL 10nM + L 50nM**	31	29,19	0,28	29,62
CL 100nM + L 50nM	31	64,55	2,98	36,43					
CL1µM + L 50nM	31	49,26	-12,96	30,78					
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
CL 100nM	24	25,83	-5,54	27,29	**CL 1µM**	24	27,13	-11,66	16,63
CL 100nM + L 50nM	31	29,68	2,98	36,43	**CL 1µM + L 50nM**	31	28,68	-12,96	30,78

Tabelle 52: Deskriptive Statistik der relativ zur Kontrolle angegebenen IL-6-Konzentrationen
CL= CL-316,243; ICI= ICI-118,551; IL= Interleukin; IQA= Interquartilsabstand; L= 748,337; Mdn.= Median; M_{Rang}= Mittlerer Rang; n= Stichprobengröße

	n	M_{Rang}	Mdn.	IQA		n	M_{Rang}	Mdn.	IQA
Kontrolle	159	131,39	0,05	13,29	**Kontrolle**	159	100,19	0,05	13,29
CL 0,1nM	23	133,91	-1,63	17,10	**CL 10nM + ICI 10nM**	20	136,25	6,71	23,58
CL 1nM	23	137,83	-1,06	11,00	**CL100nM + ICI 10nM**	20	135,80	7,05	30,38
CL 10nM	24	169,35	6,37	15,47	**CL 1µM + ICI 10nM**	20	135,95	7,44	18,96
CL 100nM	24	151,50	4,63	15,95					
CL 1µM	24	152,56	2,56	17,17					
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
ICI 10nM	22	34,96	5,85	18,03	**CL 10nM**	24	21,42	6,37	15,47
CL 10nM + ICI 10nM	20	43,75	6,71	23,58	**CL 10nM + ICI 10nM**	20	23,80	6,71	23,58
CL 100nM + ICI 10nM	20	44,45	7,05	30,38					
CL 1µM + ICI 10nM	20	43,50	7,44	18,96					
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
CL 100nM	24	20,50	4,63	15,95	**CL 1µM**	24	20,83	2,56	17,17
CL 100nM + ICI 10nM	20	24,90	7,05	30,38	**CL 1µM + ICI 10nM**	20	24,50	7,44	18,96
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
Kontrolle	159	121,62	0,05	13,29	**L 10nM**	24	67,96	9,11	17,85
CL 10nM + L 50nM	31	149,29	3,87	25,86	**CL 10nM + L 50nM**	31	63,07	3,87	25,86
CL 100nM + L 50nM	31	137,81	5,92	35,49	**CL100nM + L 50nM**	31	58,13	5,92	35,49
CL 1µM + L 50nM	31	117,42	-1,29	25,15	**CL 1µM + L 50nM**	31	48,87	-1,29	25,15
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
L 100nM	24	61,88	5,40	18,48	**CL 10nM**	24	27,46	6,37	15,47
CL 10nM + L 50nM	31	64,32	3,87	25,86	**CL 10nM + L 50nM**	31	28,42	3,87	25,86
CL 100nM + L 50nM	31	59,48	5,92	35,49					
CL1µM + L 50nM	31	50,97	-1,29	25,15					
	n	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**		**n**	**M_{Rang}**	**Mdn.**	**IQA**
CL 100nM	24	27,54	4,63	15,95	**CL 1µM**	24	30,63	2,56	17,17
CL 100nM + L 50nM	31	28,36	5,92	35,49	**CL 1µM + L 50nM**	31	25,97	-1,29	25,15

Tabelle 53: Deskriptive Statistik der relativ zur Kontrolle angegebenen IL-10-Konzentrationen
CL= CL-316,243; ICI= ICI-118,551; IL= Interleukin; IQA= Interquartilsabstand; L= 748,337; Mdn.= Median; M_{Rang}= Mittlerer Rang; n= Stichprobengröße

Im KW-Test und MWU-Test miteinander verglichenen Gruppen	Ergebnisse für die Vergleiche der IL-6-Konzentrationen	Ergebnisse für die Vergleiche der IL-10-Konzentrationen
Kontrolle CL 0,1 nM CL 1 nM CL 10 nM CL 100 nM CL 1 µM	H(5)= 20,16; p= 0,001	H(5)= 6,25; p= 0,2
Kontrolle CL 10 nM + ICI 10 nM CL 100 nM + ICI 10 nM CL 1 µM + ICI 10 nM	H(3)= 5,98; p= 0,113	H(3)= 13,92; p= 0,003
ICI 10 nM CL 10 nM + ICI 10 nM CL 100 nM + ICI 10 nM CL 1 µM + ICI 10 nM	H(3)= 2,27; p= 0,519	H(3)= 2,29; p= 0,515
CL 10 nM CL 10 nM + ICI 10 nM	U= 141,00; z= - 2,17; p= 0,030; *r*= - 0,33 [- 0,57; - 0,03]	U= 214,00; z= - 0,61; p= 0,552
CL 100 nM CL 100 nM + ICI 10 nM	U= 184,00; z= - 1,32; p= 0,193	U= 192,00; z= - 1,13; p= 0,226
CL 1 µM CL 1 µM + ICI 10 nM	U= 117,00; z= - 2,90; p= 0,003; *r*= - 0,44 [- 0,65; - 0,16]	U= 200,00; z= - 0,94; p= 0,335
Kontrolle CL 10 nM + L 50 nM CL 100 nM + L 50 nM CL 1 µM + L 50 nM	H(3)= 6,72; p= 0,081	H(3)= 4,97; p= 0,174
L 10 nM CL 10 nM + L 50 nM CL 100 nM + L 50 nM CL 1 µM + L 50 nM	H(3)= 4,19; p= 0,242	H(3)= 4,90; p= 0,179
L 100 nM CL 10 nM + L 50 nM CL 100 nM + L 50 nM CL 1 µM + L 50 nM	H(3)= 4,41; p= 0,220	H(3)= 2,68; p= 0,444
CL 10 nM CL 10 nM + L 50 nM	U= 304,00; z= - 0,92; p= 0,366	U= 359,00; z= - 0,22; p= 0,833
CL 100 nM CL 100 nM + L 50 nM	U= 320,00; z= - 0,88; p= 0,385	U= 361,00; z= - 0,19; p= 0,860
CL 1 µM CL 1 µM + L 50 nM	U= 351,00; z= - 0,36; p= 0,730	U= 309,00; z= 1,07; p= 0,291

Tabelle 54: Durchgeführten KW-Tests und MWU-Tests und deren Ergebnisse
CL= CL-316,243; ICI= ICI-118,551; IL= Interleukin; KW-Test= Kruskal-Wallis-Test; L= L-748,337; MWU-Test= Mann-Whitney-U-Test; p= p-Wert; *r*= Pearson-Korrelationskoeffizient; *z*= z-Statistik

Gruppe 1	Gruppe 2	*z-Score*	p-Wert	*r*	95% KI (*r*)
Kontrolle	CL 0,1nM	2,08	0,567	-	-
Kontrolle	CL 1nM	2,64	0,124	-	-
Kontrolle	CL 10nM	1,70	>0,999	-	-
Kontrolle	CL 100nM	1,30	>0,999	-	-
Kontrolle	CL 1µM	3,53	0,006	0,26	0,12; 0,39
CL 0,1nM	CL 1nM	0,43	>0,999	-	-
CL 0,1nM	CL 10nM	-0,28	>0,999	-	-
CL 0,1nM	CL 100nM	-0,62	>0,999	-	-
CL 0,1nM	CL 1µM	1,06	>0,999	-	-
CL 1nM	CL 10nM	-0,71	>0,999	-	-
CL 1nM	CL 100nM	-1,05	>0,999	-	-
CL 1nM	CL 1µM	0,63	>0,999	-	-
CL 10nM	CL 100nM	-0,33	>0,999	-	-
CL 10nM	CL 1µM	1,35	>0,999	-	-
CL 100nM	CL 1µM	1,70	>0,999	-	-

Tabelle 55: Paarweiser Vergleich der im signifikanten Kruskal-Wallis-Test für die IL-6-Konzentrationen eingesetzten Gruppen

Der p-Wert stellt den Bonferroni-korrigierten p-Wert für den paarweisen Vergleich dar.
CL= CL-316,243; ICI= ICI-118,551; IL= Interleukin; KI= Konfidenzintervall; *r*= Pearson-Korrelationskoeffizient

Gruppe 1	Gruppe 2	*z-Score*	p-Wert	*r*	95% KI (*r*)
Kontrolle	CL 10nM + ICI 10nM	-2,40	0,099	-	-
Kontrolle	CL100nM + ICI 10nM	-2,37	0,107	-	-
Kontrolle	CL 1µM + ICI 10nM	-2,38	0,104	-	-
CL 10nM + ICI 10nM	CL100nM + ICI 10nM	0,02	>0,999	-	-
CL 10nM + ICI 10nM	CL 1µM + ICI 10nM	0,02	>0,999	-	-
CL100nM + ICI 10nM	CL 1µM + ICI 10nM	-0,01	>0,999	-	-

Tabelle 56: Paarweiser Vergleich der im signifikanten Kruskal-Wallis-Test für die IL-10-Konzentrationen eingesetzten Gruppen

Der p-Wert stellt den Bonferroni-korrigierten p-Wert für den paarweisen Vergleich dar.
CL= CL-316,243; ICI= ICI-118,551; IL= Interleukin; KI= Konfidenzintervall; *r*= Pearson-Korrelationskoeffizient

	n	M_{Rang}	Mdn.	IQA
Kontrolle	158	161,72	-0,17	14,23
NE 10nM	38	192,76	5,74	55,78
NE 100nM	39	203,41	8,44	43,90
NE 1µM	38	204,61	13,80	43,62
NE 10µM	38	178,55	7,59	38,64
NE 100µM	39	155,28	0,42	34,83

Tabelle 57: Deskriptive Statistik der relativ zur Kontrolle angegebenen IL-6-Konzentrationen

IL= Interleukin; IQA= Interquartilsabstand; Mdn.= Median; M_{Rang}= Mittlerer Rang; n= Stichprobengröße; NE= Norepinephrin

	n	M_{Rang}	Mdn.	IQA
Kontrolle	159	149,06	0,05	13,29
NE 10nM	38	195,76	6,52	30,09
NE 100nM	39	210,000	13,01	30,23
NE 1µM	38	235,66	17,75	32,55
NE 10µM	38	248,84	18,57	31,16
NE 100µM	39	103,49	-8,94	34,79

Tabelle 58: Deskriptive Statistik der relativ zur Kontrolle angegebenen IL-10-Konzentrationen

IL= Interleukin; IQA= Interquartilsabstand; Mdn.= Median; M_{Rang}= Mittlerer Rang; n= Stichprobengröße; NA= Norepinephrin

Im KW-Test miteinander verglichenen Gruppen	Ergebnisse für die Vergleiche der IL-6-Konzentrationen	Ergebnisse für die Vergleiche der IL-10-Konzentrationen
Kontrolle NE 10 nM NE 100 nM NE 1 µM NE 10 µM NE 100 µM	H(5)= 11,74; p= 0,038	H(5)= 69,67; p≤ 0,001

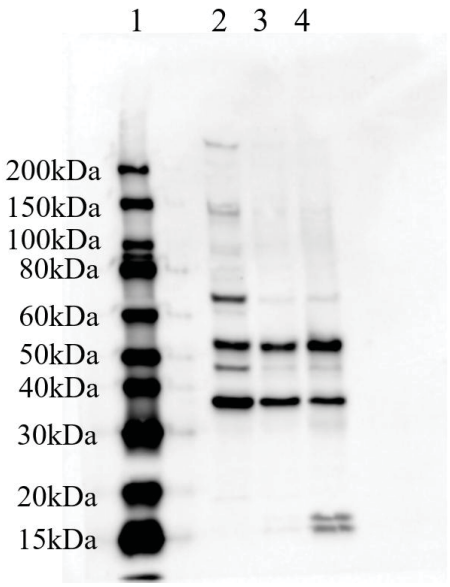
Tabelle 59: Durchgeführte KW-Tests und deren Ergebnisse
IL= Interleukin; KW-Test= Kruskal-Wallis-Test; NE= Norepinephrin; p= p-Wert

Gruppe 1	Gruppe 2	*z-Score*	p-Wert
Kontrolle	NE 10nM	-1,70	>0,999
Kontrolle	NE 100nM	-2,31	0,318
Kontrolle	NE 1µM	-2,35	0,285
Kontrolle	NE 10µM	-0,92	>0,999
Kontrolle	NE 100µM	0,36	>0,999
NE 10nM	NE 100nM	-0,46	>0,999
NE 10nM	NE 1µM	-0,51	>0,999
NE 10nM	NE 10µM	0,61	>0,999
NE 10nM	NE 100µM	1,63	>0,999
NE 100nM	NE 1µM	-0,05	>0,999
NE 100nM	NE 10µM	1,08	>0,999
NE 100nM	NE 100µM	2,10	0,535
NE 1µM	NE 10µM	1,12	>0,999
NE 1µM	NE 100µM	2,14	0,487
NE 10µM	NE 100µM	1,01	>0,999

Tabelle 60: Paarweiser Vergleich der im signifikante Kruskal-Wallis-Test für die IL-6-Konzentrationen eingesetzten Gruppen
Der p-Wert stellt den Bonferroni-korrigierten p-Wert für den paarweisen Vergleich dar.
IL= Interleukin; NE: Norepinephrin

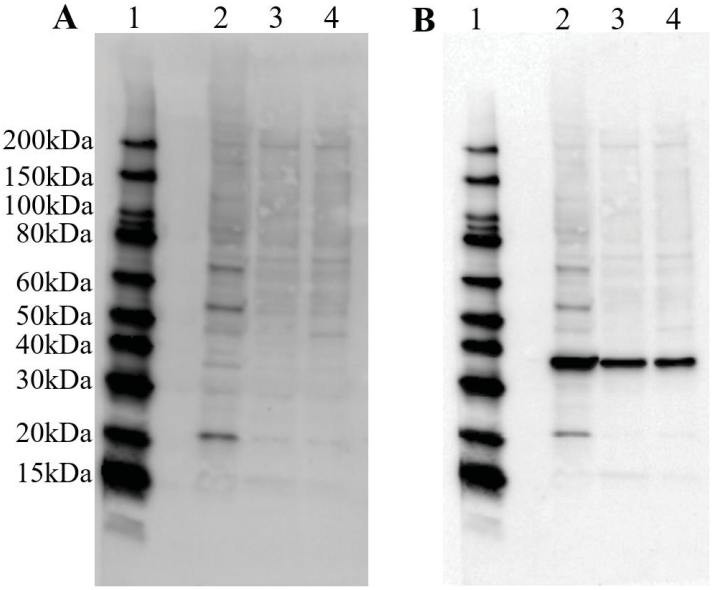
Gruppe 1	Gruppe 2	*z-Score*	p-Wert	*r*	95% KI (*r*)
Kontrolle	NE 10nM	-2,55	0,162	-	-
Kontrolle	NE 100nM	-3,36	0,012	-0,24	-0,37; -0,10
Kontrolle	NE 1µM	-4,73	<0,001	-0,34	-0,46; -0,21
Kontrolle	NE 10µM	-5,45	<0,001	-0,39	-0,50; -0,26
Kontrolle	NE 100µM	2,51	0,179	-	-
NE 10nM	NE 100nM	-0,62	>0,999	-	-
NE 10nM	NE 1µM	-1,71	>0,999	-	-
NE 10nM	NE 10µM	-2,28	0,339	-	-
NE 10nM	NE 100µM	3,99	0,001	0,46	9,26; 0,62
NE 100nM	NE 1µM	-1,11	>0,999	-	-
NE 100nM	NE 10µM	-1,68	>0,999	-	-
NE 100nM	NE 100µM	4,64	<0,001	0,53	0,34; 0,67
NE 1µM	NE 10µM	-0,57	>0,999	-	-
NE 1µM	NE 100µM	5,72	<0,001	0,65	0,50; 0,76
NE 10µM	NE 100µM	6,29	<0,001	0,72	0,59; 0,81

Tabelle 61: Paarweiser Vergleich der im signifikanten Kruskal-Wallis-Test für die IL-10-Konzentrationen eingesetzten Gruppen
Der p-Wert stellt den Bonferroni-korrigierten p-Wert für den paarweisen Vergleich dar.
IL= Interleukin; KI= Konfidenzintervall; NE: Norepinephrin, *r*= Pearson-Korrelationskoeffizient



1: Proteinmarker
2: Positivkontrolle
3: Naive B-Zellen
4: CpG stimulierte B-Zellen

Abb. 27: Western Blot zum Nachweis des Norepinephrin-Transporters (NET)
A) Detektion des NET im Zelllysat aus humanem Hirntumor (Positivkontrolle, Spur 2) sowie Lysaten von naiven (Spur 3) und 48h CpG-stimulierten BZ (Spur 4). Spezifische Banden wurden bei 53 kDa und 65 kDa detektiert. Detektion der GAPDH derselben Proben bei 37 kDa.
BZ= B-Zellen; GAPDH= Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; NET= Norepinephrin-Transporter



1: Proteinmarker
2: Positivkontrolle
3: Naive B-Zellen
4: CpG stimulierte B-Zellen

Abb. 28: Western Blot zum Nachweis des Dopamin-Transporter (DAT)
A) Detektion des DAT im Zelllysat aus humanem Hirntumor (Positivkontrolle, Spur 2) sowie Lysaten von naiven (Spur 3) und 48h CpG-stimulierten BZ (Spur 4). Spezifische Banden wurden nur in der Positivkontrolle bei 68 kDa detektiert.
B) Detektion der GAPDH derselben Proben bei 37 kDa.
BZ= B-Zellen; DAT= Dopamin-Transporter; GAPDH= Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

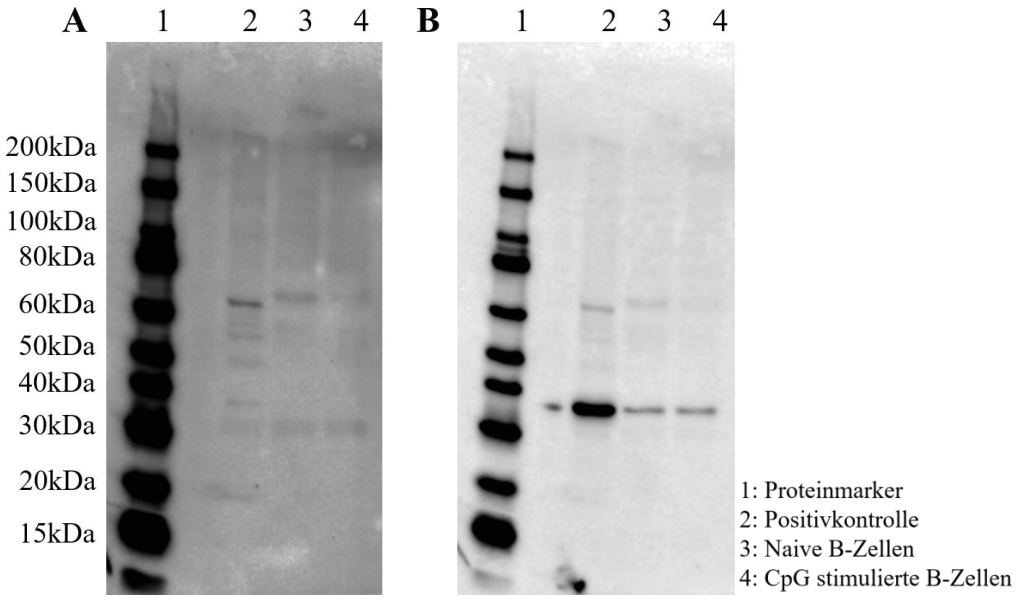


Abb. 29: Western Blot zum Nachweis der Monoaminooxidase A (MAO-A)
A) Detektion der MAO-A im Zelllysat aus humanem Hirntumor (Positivkontrolle, Spur 2) sowie Lysaten von naiven (Spur 3) und 48h CpG-stimulierten BZ (Spur 4). Spezifische Banden wurden in der Positivkontrolle und in naiven BZ bei 60 kDa detektiert. **B**) Detektion der GAPDH derselben Proben bei 37 kDa.
BZ= B-Zellen; GAPDH= Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; MAO-A= Monoaminooxidase A

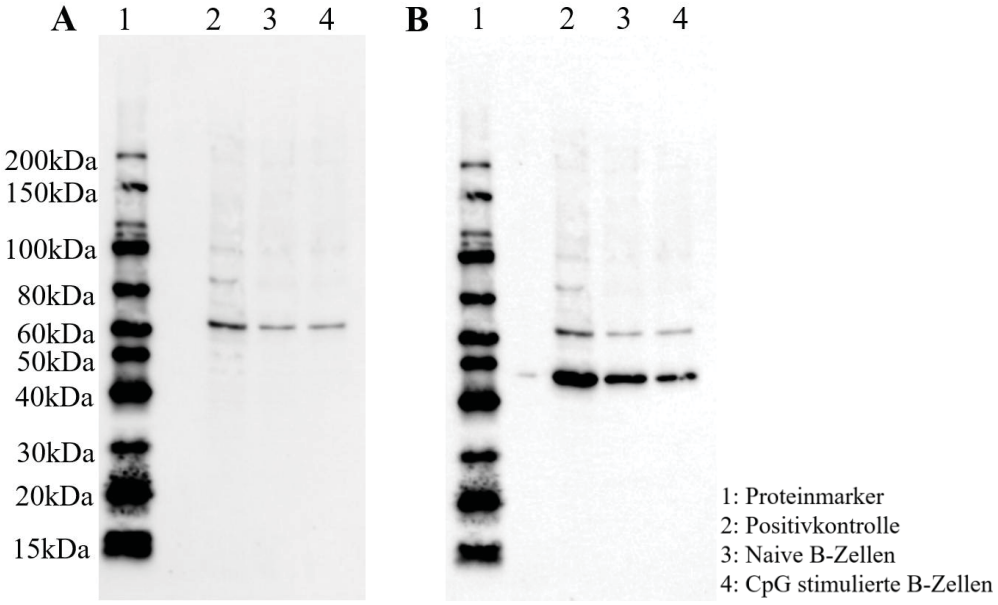


Abb. 30: Western Blot zum Nachweis der Monoaminooxidase B (MAO-B)
A) Detektion der MAO-B im Zelllysat aus humanem Hirntumor (Positivkontrolle, Spur 2) sowie Lysaten von naiven (Spur 3) und 48h CpG-stimulierten BZ (Spur 4). Spezifische Banden wurden bei 60 kDa detektiert. **B**) Detektion der GAPDH derselben Proben bei 37 kDa.
BZ= B-Zellen; GAPDH= Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; MAO-B= Monoaminooxidase B

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen beteiligten Personen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. rer. nat. Torsten Lowin, der mir die Möglichkeit gab, diese Dissertation unter seiner Betreuung durchzuführen. Für seine fachliche Anleitung, seine wertvollen Anregungen und kontinuierliche Unterstützung danke ich ihm sehr.

Ich danke dem Hiller Forschungszentrum und den Mitarbeitern vor Ort, die mich aufgenommen und mir die Durchführung meiner Forschungstätigkeit im Labor ermöglicht haben. Die dort geschaffenen Rahmenbedingungen waren eine wichtige Voraussetzung für das Gelingen dieser Arbeit.

Ich danke allen Probenden, die für diese Forschungszwecke Blut gespendet haben.

Ein besonderer Dank gilt meinem Freund Tobias Behn, der mich während der gesamten Entstehung dieser Dissertation begleitet hat. Er unterstütze mich unermüdlich auf allen Ebenen bei der Erstellung dieser Arbeit, ermutigte mich immer wieder und stand mir jederzeit, auch in anspruchsvollen Phasen mit Zuspruch und Verständnis zur Seite.

Darüber hinaus möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern danken, die mich während meines gesamten Studiums stets ermutigt und mir in allen Phasen insbesondere emotionalen Rückhalt gegeben hat. Ohne ihre Unterstützung und ihr Vertrauen wäre es mir nicht möglich gewesen, diesen Weg zu gehen.