

Aus dem Institut für Klinische Neuroimmunologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Kerschensteiner

Interleukin 35 produzierende humane regulatorische B Zellen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Junqing Jiang
aus Shanghai
2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Edgar Meinl

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Astrid Blaschek
PD Dr. med. Markus Kumbholz

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Franziska Thaler

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 21.01.2021

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Eidesstaatliche Versicherung

Jiang, Junqing

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Interleukin 35 produzierende humane regulatorische B Zellen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 21.01.2021

Junqing Jiang

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand

Inhaltsverzeichnis

Eidesstaatliche Versicherung	4
Abkürzungsverzeichnis	9
Abbildungsverzeichnis	11
Tabellenverzeichnis	12
1 Einleitung	13
1.1 Das Immunsystem.....	13
1.2 B Zellen im Immunsystem	13
1.3 Toll-like Rezeptoren (TLRs).....	17
1.4 Regulatorische B-Zellen bei Autoimmunerkrankungen	18
1.5 Interleukin-35 als regulatorisches Zytokin	20
1.6 Multiple Sklerose	22
1.6.1 Klinik und Diagnose.....	22
1.6.2 Pathogenese	22
1.6.3 Therapie.....	24
1.6.3.1 Rituximab.....	24
1.6.3.2 Fingolimod.....	26
1.7 Zielsetzung.....	29
2 Material	30
2.1 Lösungen.....	30
2.2 Chemikalien.....	30
2.3 Geräte.....	31
2.4 Kits	31
2.5 Zellstimulantien	32
2.6 Verbrauchsmaterialien.....	32
2.7 Antikörper	33
2.7.1 Durchflusszytometrie: Oberflächenfärbung	33
2.7.2 Durchflusszytometrie: Intrazelluläre Färbung.....	33
2.8 Computersoftware	34
2.9 Zelllinien	34
3 Methoden.....	35

3.1	Zählmethode von Zellen.....	35
3.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	35
3.3	Zellisolationen.....	35
3.3.1	Isolation von peripheren mononukleären Zellen im Blut.....	35
3.3.2	Isolation von humanen B Zellen aus peripheren mononukleären Zellen.....	36
3.4	Zellseparationen.....	37
3.4.1	Prinzip der Zellseparation mithilfe Miltenyi Biotec MACS® Separation.....	37
3.4.2	Miltenyi Biotec MACS® Separation CD38 MicroBead Kit.....	38
3.4.3	Miltenyi Biotec MACS® Separation CD138 MicroBead Kit.....	38
3.5	Zellkultur.....	38
3.5.1	Stimulation von PBMCs mit Resiquimod (R848) und IL-2.....	39
3.5.2	Stimulation von B Zellen mit CD40L (=CD154).....	39
3.5.3	Stimulation von B-Zellen mit TLR Liganden.....	40
3.5.4	Stimulation von B Zellen mit Fingolimod.....	41
3.5.5	JK6L Zellkultur.....	41
3.6	ELISAs.....	41
3.6.1	Prinzip des ELISA.....	41
3.6.2	IL-10 ELISA.....	42
3.6.3	IL-35 ELISA.....	42
3.6.4	ELISA Messung.....	44
3.6.5	ELISA Auswertung.....	44
3.7	Durchflusszytometrie.....	44
3.7.1	Prinzip der Durchflusszytometrie.....	44
3.7.2	Extrazelluläre FACS Oberflächenfärbung.....	45
3.7.3	Intrazelluläre FACS Färbung.....	45
3.7.3.1	Prinzip der intrazellulären FACS Färbung.....	45
3.7.3.2	Protokoll der intrazellulären FACS Färbung.....	46
3.7.4	Durchflusszytometrische Messung.....	46
3.7.5	Durchflusszytometrische Auswertung.....	46
3.7.5.1	Prinzip der IL-35 Färbung.....	47
3.8	Quantitative PCR (qPCR).....	48
3.8.1	Prinzip der quantitativen PCR.....	48
3.8.2	Isolieren von RNS aus Zellen.....	49
3.8.3	Reverse Transkription.....	49
3.8.4	qPCR Durchführung.....	50
3.8.5	qPCR Auswertung.....	50
3.9	Patienten und Probanden.....	51

3.10	Statistische Analysen	52
4	Ergebnisse	53
4.1	IL-35 und IL-10 Produktion von humanen B Zellen durch Stimulation mit TLR – Liganden und CD40L	53
4.1.1	Regulatorische B-Zellen werden nach Stimulierung von zwei Tagen rekrutiert	53
4.1.2	IL-35 und IL-10 Produktion von humanen B Zellen wird induziert mittels Koaktivierung von TLR7/8, 9 und CD40L	55
4.2	IL-35-Produktion durch menschliche B-Zellen kann durch FACS-Analyse in heterogenen B-Zellpopulationen mit Dominanz in Plasmablasten und Plasmazellen bestimmt werden.....	57
4.2.1	Zielstellung	57
4.2.2	Etablierung der intrazellulären IL-35 und IL-10 Färbung.....	57
4.2.3	Phänotypisierung IL-35-produzierender B Zellen (B35 Zellen)	58
4.2.3.1	Durchflusszytometrische Analyse.....	58
4.2.3.2	ELISA Analyse	62
4.2.4	Plasmazytom Zelllinie JK6L produziert IL-35	64
4.2.5	Gegenüberstellung des Phänotyps von B35 und B10 Zellen	65
4.3	Einfluss von Fingolimod auf regulatorische B Zellen	66
4.3.1	Fingolimod erhöht B10 und B35 Zellen in vitro	66
4.3.2	Fingolimod induziert nicht die CD38-Expression der B-Zellen	68
4.4	Klinische Relevanz von IL-35 bei MS Patienten.....	69
4.4.1	IL-35 Werte sind vermindert im Plasma von MS Patienten	69
4.4.2	Fingolimod und Rituximab haben keinen eindeutigen Einfluss auf IL-35 und IL-10 Plasmawerte bei Multiple Sklerose Patienten	71
5	Diskussion.....	73
5.1	Regulatorische B-Zellen	73
5.1.1	Phänotyp	73
5.1.2	Stimulation	75
5.2	IL-35.....	75
5.2.1	Detektion von IL-35	75
5.2.2	Betrachtung der Homodimeren und Monomeren von p35 und EB13	76
5.2.3	Therapeutische Relevanz von rekombinantem IL-35 und p35	77
5.3	Klinische Relevanz von regulatorischen Zytokinen bei Multipler Sklerose	78
5.3.1	Fingolimod	78
5.3.2	Rituximab	80
6	Zusammenfassung.....	81

7	Literaturverzeichnis	82
8	Danksagung.....	92

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
BSA	bovines Serum Albumin
°C	Grad Celsius
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNS	<i>complementary DNS</i>
CIS	klinisch isoliertes Syndrom
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotid
CSF	<i>Cerebrospinal fluid</i>
Ct	<i>Threshold cycle</i>
d	<i>day</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EBI3	Epstein-Barr-virus- <i>induced gene 3</i>
Engl.	Englisch
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC	<i>Forward Scatter</i>
G	Erdbeschleunigung
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IL	Interleukin
IE	Internationale Einheiten
Da	Dalton
L	Ligand
LPS	Lipopolysaccharide
l	Liter
M	mol

m	mili
MACS	magentische Zellsortierung
MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i>
min	Minute
mL	Milliliter
MS	Multiple Sklerose
μ	Mikro
N	Normalität
n	Nano
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren
ANE	andere neurologische Erkrankungen
AENE	andere neuroinflammatorische Erkrankungen
PBMC	periphere mononukleäre Zellen des Blutes
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein Complex
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
R848	Resiquimod
RNS	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
Rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SSC	<i>Sideward Scatter</i>
SD	Standardabweichung
TLR	Toll <i>like</i> Rezeptor
UNG	Uracil-N-glycosylase

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 B-Zell-Entwicklung.	14
Abb. 2 Klassische Antigenpräsentation mittels MHC-II.	16
Abb. 3 IL-12 Zytokin-Familie.	20
Abb. 4 Repräsentative Standardkurve des IL-35 ELISA Kits.	43
Abb. 5 CD19 B-Zell <i>Gating</i>	47
Abb. 6 Prinzip der IL-35 Färbung.....	48
Abb. 7 Zeitstrahl der IL-10-Produktion.	54
Abb. 8 Humane B-Zellen produzieren IL-35 nach Stimulation.	56
Abb. 9 IL-35 und IL-10 <i>Gating</i> Strategie.	58
Abb. 10 IL-35 Oberflächenmarkerexpression.	59
Abb. 11 IL-10 Oberflächenmarkerexpression.	60
Abb. 12 Charakterisierung von IL-35/IL-10 B-Zellsubpopulationen.....	61
Abb. 13 Stimulierte PBMCs produzieren mehr IL-35 als unstimulierte PBMCs.	63
Abb. 14 CD38+ B-Zellen produzieren signifikant mehr IL-35 als nicht stimulierte B-Zellen..	63
Abb. 15 IL-35-Freisetzung von CD138+ und CD138- B-Zellen.....	64
Abb. 16 Plasmazytom Zelllinie JK6L produziert IL-35.....	65
Abb. 17 IL-35+IL-10 Co-Färbung von B Zellen.	66
Abb. 18 FTY erhöht prozentual die IL-35/IL-10 Zellzahl.....	67
Abb. 19 FTY verändert IL-35/IL-10 im ELISA nicht signifikant.	68
Abb. 20 FTY-P hat keinen Einfluss auf die CD38 Expression von B Zellen.....	69
Abb. 21 IL-35 Werte bei MS Patienten sind vermindert.	70
Abb. 22 IL-35/IL-10-Plasmawerte von MS Patienten vor und nach Fingolimod bzw. Rituximab Behandlung.....	72

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Übersicht der CD-Oberflächenmarker auf B-Zell-Subpopulationen.	15
Tab. 2 Antikörper Oberflächenfärbung	33
Tab. 3 Antikörper intrazelluläre Färbung	34
Tab. 4 Charakterisierung der Patientenproben	51
Tab. 5 Behandlungsdauer der Patienten mit Multipler Sklerose: Fingolimod, Rituximab.	52

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein interagierendes Netzwerk aus lymphatischen Organen, Zellen und Zytokinen, dessen Funktion in der Wirtsabwehr liegt. Menschen und andere Säugetiere sind ständig Organismen ausgesetzt, die eingeatmet und verschluckt werden oder auf der Haut und den Schleimhäuten leben. Um pathogene mikrobielle Bestandteile sowie entartete körpereigene Zellen zu erkennen und eliminieren zu können, werden sowohl angeborene als auch adaptive Mechanismen verwendet. Der Begriff der angeborenen Immunität schließt in erster Linie physikalische, chemische und mikrobiologische Barrieren ein, umfasst zudem auch Bestandteile des Immunsystems, darunter neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und Komplementfaktoren, die eine unmittelbare Wirtsabwehr gewährleisten. Sie ist bereits bei Geburt vorhanden und nicht erworben. Allerdings sind die Komponenten der angeborenen Immunität lediglich dazu befähigt, Fremdartige nach einem System wiederkehrender Strukturmerkmale zu erkennen - eine Fähigkeit, die selbst bei den einfachsten Lebewesen beobachtet wird. Die adaptive Immunität hingegen ist das Kennzeichen der Evolution des Immunsystems höher entwickelten Vertebraten. Sie besteht aus Antigen-spezifische Reaktionen durch T- und B-Lymphozyten. Während die angeborene Immunität sofort auslösbar, jedoch unspezifisch ist, wird die adaptive Immunreaktion durch hohe Anpassungsfähigkeit und folglich hoher Spezifität gekennzeichnet. Der Prozess dieser Reaktion nimmt mehrere Tage oder Wochen in Anspruch. Nach Abschluss bleiben spezifische Antikörper und Gedächtniszellen erhalten, um bei erneutem Antigenkontakt innerhalb kürzester Zeit eine angemessene Abwehr zu etablieren [1].

1.2 B Zellen im Immunsystem

B-Zellen spielen eine Hauptrolle in der adaptiven Immunität und haben die wichtige Fähigkeit Antikörper zu produzieren. Über verschiedene Differenzierungswege können T-Zell-abgänglich sowie T-Zell-unabhängig B-Zellen aktiviert werden, um Plasmazellen und Gedächtnis-B-Zellen zu bilden [2]. Der Begriff *Cluster of Differentiation* (CD) fasst verschiedene Gruppen von über 300 immunphänotypischen Oberflächenmarkern von Zellen zusammen, die sich nach biochemischen und funktionellen Kriterien ordnen lassen [3]. Bezüglich der B-Zell-Differenzierung erfahren diese CD-Membranproteine auf der B-Zelloberfläche eine charakteristische Entwicklung.

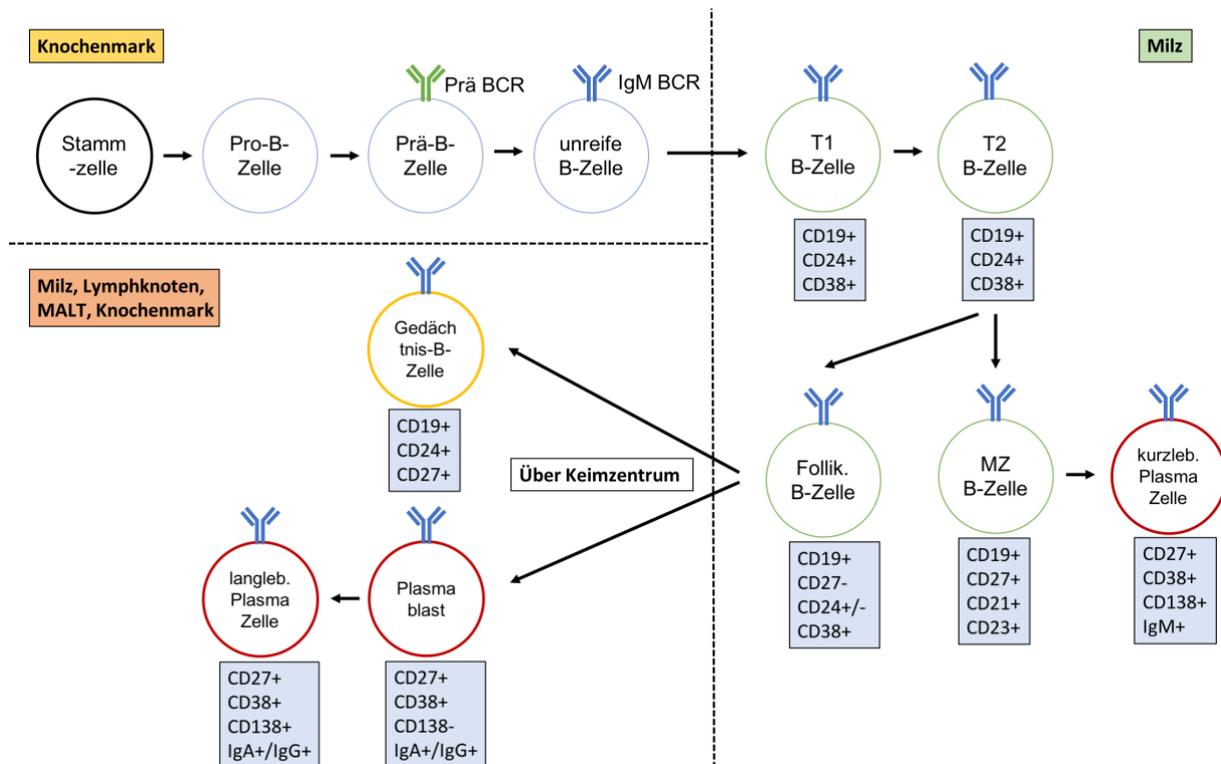


Abb. 1 B-Zell-Entwicklung. B-Zellen entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Die Rekombination der Schwereketten beginnt im Pro-B-Zellstadium. Im Prä-B-Zellstadium wird ein Prä-B-Zellrezeptor (Prä BCR) durch zwei identische Schwereketten und jeweils einem Platzhalter der Leichtkette geformt. Es beginnt hier nun die Rekombination der Leichtkette. Im darauffolgenden Stadium der unreifen B-Zelle wird aus den fertigen Leichtketten und Schwereketten ein kompletter B-Zellrezeptor als IgM (IgM BCR) auf der Oberfläche exprimiert. Unreife B-Zellen gelangen nun über die Blutzirkulation in die Milz als Transitionale 1 und 2 (T1 und T2) -B-Zellen und entwickeln sich zu Marginalzonen (MZ) -B-Zellen oder Follikuläre B-Zellen, je nach Spezifität ihres B-Zellrezeptors. Nach Kontakt mit einem passenden Fremdantigen entwickeln sich Marginalzonen-B-Zellen zu kurzlebigen Plasmazellen. Mit Hilfe von T-Helfer Zellen reifen follikuläre B-Zellen in Keimzentren zu Gedächtnis-B-Zellen oder über Plasmablasten zu langlebigen Plasmazellen. [4]

B-Zellen gehen aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks hervor (s. Abb. 1), wo sie im Pro-B-Zell Stadium durch Rearrangement der Immunglobulin-Gensegmente der Schwere- und Leichtketten mehr als 5×10^{13} Variationen der Antigenerkennung entwickeln können. B-Zellen exprimieren hierbei CD19, ein Oberflächenmarker peripherer B-Zellen aller Reifungsstadien, der jedoch während der terminalen Differenzierung zu Plasmablasten und Plasmazellen fortschreitend verloren geht [5]. In der anschließenden „Prä-B-Zell“-Phase entsteht aus einem Prä-B-Zellrezeptor ein membrangebundenes IgM als B-Zellrezeptor mit zellindividueller Spezifität. In diesem Stadium werden die Zellen auch unreife B-Zellen genannt. Nach Negativselektion autoreaktiver unreifer B-Zellen migrieren diese als T1-transitionale und als T2-transitionale B-Zellen ($CD19^+CD24^+CD38^+$) [6] über die Blutzirkulation in die Milz, wo sie Überlebenssignale durch BAFF (engl. *B Cell Activating*

Factor of the TNF-Family) erhalten. Dort schließen sie in Abhängigkeit der Spezifität des B-Zellrezeptors ein weiteres Entwicklungsstadium als reife naive folliculäre (CD19+CD27-CD24+/- CD38+) oder Marginalzonen-B-Zellen (CD19+CD27+CD21+CD23+) ab [7]. Naive folliculäre B-Zellen können nun durch Re-Zirkulation in sekundäre lymphatische Organe, wie Milz und Lymphknoten, migrieren, um dort mithilfe ihres B-Zell-Rezeptors ein passendes Antigen zu binden und aktiviert zu werden. Dabei wird der Antigen-B-Zellrezeptor-Komplex endozytotisch aufgenommen, anschließend zu Peptiden prozessiert und über MHC-2 Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert. Von Chemokinen geleitet, wandern folliculäre B-Zellen in die Keimzentren der sekundär lymphatischen Organen, wo sie sich mittels T-Helfer-Zell-Interaktion zu CD24+CD27+ Gedächtnis-B-Zellen [6] und langlebigen CD27+CD38+ Plasmablasten bzw. CD38+CD138+ Plasmazellen [4, 8] entwickeln. In der Milz ansässige Marginalzonen-B-Zellen vermitteln hingegen T-Zell-unabhängige Immunantworten und werden nach Aktivierung zu kurzlebige Plasmazellen. CD27 ist ein weit verbreiteter Marker für Gedächtnis-B-Zellen [9]. Eine Übersicht über die charakteristische CD-Membranprotein-Entwicklung der B-Zellen ist in der Tabelle 1 zusammenfassend dargestellt.

<i>Subpopulation</i>	<i>CD19</i>	<i>CD24</i>	<i>CD38</i>	<i>CD27</i>	<i>CD138</i>	<i>CD10</i>
<i>Unreif</i>	+	+	+	-	-	+
<i>T1</i>	+	+	+	-	-	+
<i>T2</i>	+	+	+	-	-	+
<i>MZ</i>	+	-/+	+	+	-	-
<i>Follikulär</i>	+	-/+	+	-	-	-
<i>Gedächtnis</i>	+	+	-	+	-	-
<i>Plasmablast</i>	-	-/+	+	+	-	-
<i>Plasmazelle</i>	-	-	+	+	+	-

Tab. 1 Übersicht der CD-Oberflächenmarker auf B-Zell-Subpopulationen. T1/T2 = Transitionale 1/2-B-Zellen, MZ=Marginalzonen-B-Zellen. „+“ = CD-Marker positiv „-“ = CD-Marker negativ „-/+“ = verschiedene Expressionen möglich.

Es ist eine Grundregel der adaptiven Immunität, dass naive Antigen-spezifische Lymphozyten durch Antigenkontakt allein schwer zu aktivieren sind [10]. Naive T-Zellen benötigen zur Aktivierung ein ko-stimulierendes Signal von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APCs). Naive B-Zellen benötigen wiederum Signale, die entweder von einer aktivierten T-

Helfer-Zelle oder in einigen Fällen direkt von mikrobiellen Bestandteilen stammen können. Zu den klassischen APCs gehören dendritische Zellen, welche in vielen Ausprägungen in nahezu allen Organen vorkommen, insbesondere in sekundären lymphatischen Organen. Neben dendritischen Zellen zählen auch Monozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten zu den APCs. Damit werden Zellen zusammengefasst, die neben MHC-I auch über MHC-II-Moleküle T-Helfer-Zellen potentielle Pathogene präsentieren können. Hierfür nehmen APCs Antigene zunächst rezeptorvermittelt endosomal auf und degradieren diese lysosomal. In den Lysosomen werden diese prozessierten Peptide mit MHC-Klasse-II Molekülen beladen, woraufhin sie schließlich als Komplex an die Zelloberfläche transportiert und an CD4+ T-Helfer-Zellen präsentiert werden [11]. T-Zellen erkennen solche MHC-II gebundenen Peptidbruchstücke mit ihrem T- Zellrezeptor und werden klonal aktiviert. Diese T-Zellen können im weiteren Schritt B-Zellen aktivieren, wenn sie das entsprechende Peptid desselben Antigens auf MHC-II-Molekülen der B-Zelle erkennen. Dieser Vorgang kann besonders effiziente B-Zellantworten bei niedrigen Antigen-Konzentrationen induzieren [12] (s. Abb. 2).

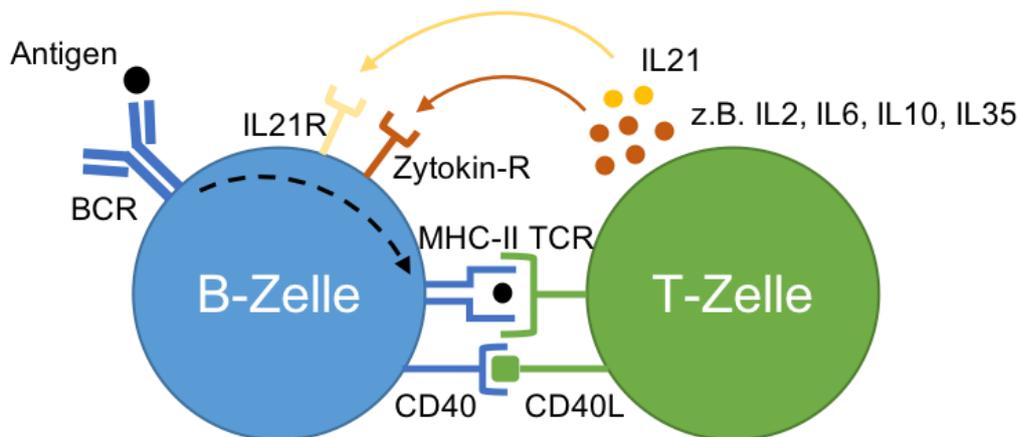


Abb. 2 Klassische Antigenpräsentation mittels MHC-II. BCR=B-Zell-Rezeptor, TCR=T-Zell-Rezeptor, Zytokin-R=Zytokin-Rezeptor. Antigenpräsentation zwischen B- und T-Zelle durch das entsprechende prozessierte Antigen über MHC-II löst eine Aktivierung der B-Zelle durch sezernierte Effektormoleküle aus, z.B. IL21, IL2, IL6, IL10, IL35. Wichtig hierbei ist die Aktivierung durch CD40L=CD154. Schwarzer gestrichelter Pfeil=Antigen wird B-Zellrezeptor-vermittelt endozytotisch aufgenommen, endosomal prozessiert und als Peptid über MHC-II präsentiert.

Die sogenannte klassische Antigenpräsentation über MHC-II löst bei T-Helfer-Zellen die Synthese von sowohl Zellmembran-gebundenen als auch sezernierten Effektormolekülen aus, die bei der Aktivierung der B-Zelle synergistisch wirken. Ein besonders wichtiges T-Zell-Effektormolekül ist ein membrangebundenes Molekül der Tumornekrosefaktor (TNF) - Familie, bekannt als CD40-Ligand (CD40L, auch bekannt als CD154). B-Zell-gebundenes

CD40 ist ein Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie von Zytokinrezeptoren, enthält jedoch keine "Todesdomäne". Es ist an der Lenkung aller Phasen der B-Zell-Antwort beteiligt. Die Bindung von CD40 durch CD40L hilft dabei, die ruhende B-Zelle in den Zellzyklus zu treiben und ist verantwortlich für den Ig-Klassenwechsel [13]. Unter den sezernierten Effektormolekülen ist für die Proliferation der B-Zellen Interleukin-2 (IL-2) wichtig. Menschliches IL-2 ist ein Glykoprotein mit einer molaren Masse von 15.400 Da, das von T-Lymphozyten nach Stimulation mit einem Antigen freigesetzt wird und als T-Zell-Wachstumsfaktor fungiert. B-Zellen verfügen ebenso über IL-2 Rezeptoren auf der Zelloberfläche, die für deren Differenzierung und Proliferation zu Plasmazellen verantwortlich sind [14]. In diesem Prozess spielt IL-21 ebenso eine wichtige Rolle. Versuche mit einer menschlichen B-Zelllinie zeigten, dass für eine optimale Plasmazell-Differenzierung sowohl IL-21 als auch CD40L benötigt werden [15]. Im Rahmen in dieser Arbeit relevanten Stimulationsprotokolle wird sowohl auf IL-2, als auch IL-21 und CD40L zurückgegriffen.

Bezogen auf die große Vielfalt an Antikörper-Bindungsspezifitäten ist das Immunsystem mit der Herausforderung konfrontiert der Autoimmunität gegenzusteuern. Defekte in der B-Zell Entwicklung können zu autoimmunen Erkrankungen, Malignomen, Immundefizienzen und Allergien führen, weshalb die Untersuchung von B-Zellen einen wichtigen Bestandteil zum Verständnis und Therapie dieser Erkrankungen darstellt.

1.3 Toll-like Rezeptoren (TLRs)

Toll-like Rezeptoren (TLRs) spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems einschließlich Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen, sowie der T-Zell-unabhängigen Aktivierung von B-Zellen und damit der adaptiven Immunantwort. Toll-like-Rezeptoren (TLRs) sind Typ-I-Transmembran-Glykoproteine [16]. Sie bestehen aus einer transmembranen und einer intrazellulären Domäne und sind klassifiziert als *Pattern Recognition Receptors* (PRRs), da sie molekulare Strukturen in Pathogenen erkennen, die als *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs) bezeichnet werden [17]. Bislang wurden 10 menschliche TLRs identifiziert, die verschiedene Antigene von Bakterien und Viren erkennen, wie Lipopolysaccharid (LPS), einzelsträngige RNS (ssRNA) und CpG-haltige DNS. TLRs befinden sich auf der Zelloberfläche (TLRs 1, 2, 4, 5, 6, 10) oder haben eine endosomale Lokalisation (TLRs 3, 7, 8, 9) [18]. Alle 10 TLRs werden in menschlichen Makrophagen exprimiert, wobei Mäuse zusätzlich TLR11, 12 und 13 exprimieren [19]. Die Aktivierung durch TLRs ist entscheidend für die Initiation der schnellen Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-6. Bei B-Zellen ist dieser Mechanismus vor

allem bei Marginalzonen-B-Zellen entscheidend. In der Milz sind sie die erste Verteidigungslinie gegen im Blut übertragbare Pathogene [20]. Während der ersten drei Tage einer Infektion entwickeln sie sich rasch zu extrafollikulären Plasmazellen, die IgM sezernieren, welche Immunkomplexe mit dem Erreger bilden [21]. Als membrangebundener TLR Rezeptor erkennt TLR2, aufgrund seiner Komplexbildung mit TLR1 und TLR6, das breiteste Spektrum von Liganden unter den TLRs [22]. Durch diese Komplexbildung werden Diacylglycerol-Acyلكetten und N-Acyلكetten, sowie Lipoteichonsäuren aus Gram-positiven Bakterien [23] und Lipoarabinomannan aus Mycobakterien gebunden [24]. TLR4 erkennt als Zelloberflächenrezeptor Lipopolysaccharide (LPS), ein Bestandteil der meisten gramnegativen und einiger grampositiver Bakterien [25]. TLR5 bindet bakterielles Flagellin und hat eine basolaterale Lokalisation im Darmepithel um auf Flagellin von invasiven Pathogenen zu reagieren [26]. Es wurde gezeigt, dass TLR5 an der Entstehung vieler Krankheiten wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beteiligt ist [27]. Zu den endosomalen TLRs gehört zunächst TLR3, der doppelsträngige RNS (dsRNA) erkennt, die während der Replikation von positivsträngigen RNS-Virus gebildet wird [28]. Eine endosomale Lokalisation besitzt ebenso TLR9, welcher bakterielle DNS erkennt, die reich an unmethylierten CpG-Motiven ist [29], während TLR7 und TLR8 virale einzelsträngige RNS (ssRNA) erkennen [30]. Im Gegensatz zu anderen TLRs aktiviert TLR10 das Immunsystem nicht und hat stattdessen regulatorische Einflüsse auf die Entzündungskaskade. Dies macht TLR10 einzigartig in der TLR-Familie. Derzeit ist noch kein Ligand für TLR10 bekannt [31].

1.4 Regulatorische B-Zellen bei Autoimmunerkrankungen

Das Kennzeichen einer wirksamen Immunantwort ist die Ausbildung einer Entzündungsreaktion, die entscheidend für die Heilung der Infektion durch den Krankheitserreger ist. Ein Voranschreiten dieser Reaktion führt jedoch zur Schädigung des Gewebes und zur Entwicklung einer Vielzahl immunvermittelter Erkrankungen [32]. Im gesunden Individuum ist die Entzündung selbstlimitierend und die Auflösung wird durch Freisetzung von entzündungshemmenden Mediatoren und Zytokinen, wie Interleukin-10 (IL-10) kontrolliert, die von sogenannten „regulatorischen“ Immunzellen produziert werden. Umgekehrt ist das Immunsystem bei Personen mit chronischer Entzündung persistent aktiv. Ihr Zustand ist oft gekennzeichnet durch einen qualitativen und quantitativen Mangel der regulatorischen Zellen im Kreislauf sowie an der Entzündungsstelle [33]. In den letzten zehn Jahren wurde eine Population von regulatorischen B-Zellen (Bregs) mit der Hemmung übermäßiger Entzündungsreaktionen in Verbindung gebracht [34]. Die Depletierung von B-Zellen [35], insbesondere IL-10-produzierenden B-Zellen [36] in Mäusen, hat gezeigt, dass eine

fehlerhafte Breg-Zellentwicklung zu chronischer Entzündung führt. Zur primären Funktion von Breg-Zellen wird die Aufrechterhaltung regulatorischer T-Zellen (Tregs) gezählt, während die inflammatorische T-Zell-Differenzierung (v.a. T-Helfer-1- und T-Helfer-17-Zellen) bei Menschen [37] und Mäusen [38] unterdrückt wird. Allerdings bleibt der genaue Phänotyp dieser regulatorischen B-Zellen umstritten und Bregs werden als ein Kollektiv von B-Zellen zusammengefasst, die in ihrer Funktion regulatorische Fähigkeiten besitzen. Beim Menschen wurden sowohl CD19+CD24+CD38+ [39] als auch CD19+CD24+CD27+ Breg-Zellen identifiziert [40]. Bei Mäusen wurden noch mehr Teilmengen IL-10-produzierender Zellen einschließlich CD21+CD23+IgM+ Transitional-2-Marginalzonen-Vorläufer (T2-MZP) B-Zellen [41, 42], CD5+CD1dhi-B-Zellen [43, 44], Marginalzonen-B-Zellen [45], CD138+ Plasmazellen [46, 47] und Plasmablasten [48] gefunden. Obwohl die Expression von IL-10 bei der Definition von regulatorischen B-Zell-Populationen in Mäusen und Menschen nützlich war, werden jedoch viele Oberflächenmarker, die zur Identifizierung von Breg-Zellen verwendet wurden, während der Immunaktivierung hoch- oder herunterreguliert. Diese Tatsache ist für einige der Diskrepanzen in den beschriebenen Breg-Zell-Untergruppen verantwortlich. Bis heute können zwei Modelle der Breg-Zellentwicklung postuliert werden. Das erste Modell beschreibt eine eigene Entwicklungslinie von B-Zellen, bei welcher ein spezifischer Transkriptionsfaktor die Expression jener Gene steuert, die für ihre regulatorische Funktion verantwortlich sind. Die zweite Theorie meint, dass B-Zellen als Reaktion auf bestimmte Stimuli einen regulatorischen Phänotyp annehmen, um lokale Entzündungen zu unterdrücken. Trotz erheblicher Anstrengungen hat keine Studie, die Gen-Arrays an Breg-Zellen sowohl bei Mäusen [47] als auch bei Menschen [49] durchgeführt hat, einen spezifischen Transkriptionsfaktor entsprechend der ersten Theorie eindeutig identifiziert. Das Scheitern der Identifikation eines einzigartigen Transkriptionsfaktors, zusammen mit der Heterogenität des Phänotyps von Breg-Zellen, unterstützt die Theorie, dass regulatorische B-Zellen nicht spezifisch, sondern "reaktiv" sind. Im Gegensatz zu natürlichen Treg-Zellen könnte sich demnach jede B-Zelle in Reaktion auf die richtigen Umweltreize potentiell zu einer "Breg" - Zelle differenzieren. Vor diesem Hintergrund ist die Identifizierung von Breg-fördernden Stimuli ein wichtiger Gesichtspunkt in der Beurteilung der Herkunft dieser B-Zellen. Toll-like Rezeptor (TLR)- und CD40-Aktivierung sind die bisher am besten charakterisierten Signale, die ihre Differenzierung induziert [34].

1.5 Interleukin-35 als regulatorisches Zytokin

Kürzlich wurde im Mausmodell gezeigt, dass Breg-Zellen neben der Fähigkeit IL-10 zu produzieren auch das regulatorische Zytokin IL-35 [47] exprimieren. IL-35 gehört zur IL-12-Familie, einer einzigartigen Gruppe heterodimerer Zytokine, wie IL-12, IL-23, IL-27 und IL-35, die strukturelle Gemeinsamkeiten aufweisen, jedoch unterschiedliche immunologische Funktionen vermitteln (s. Abb. 3) [50].

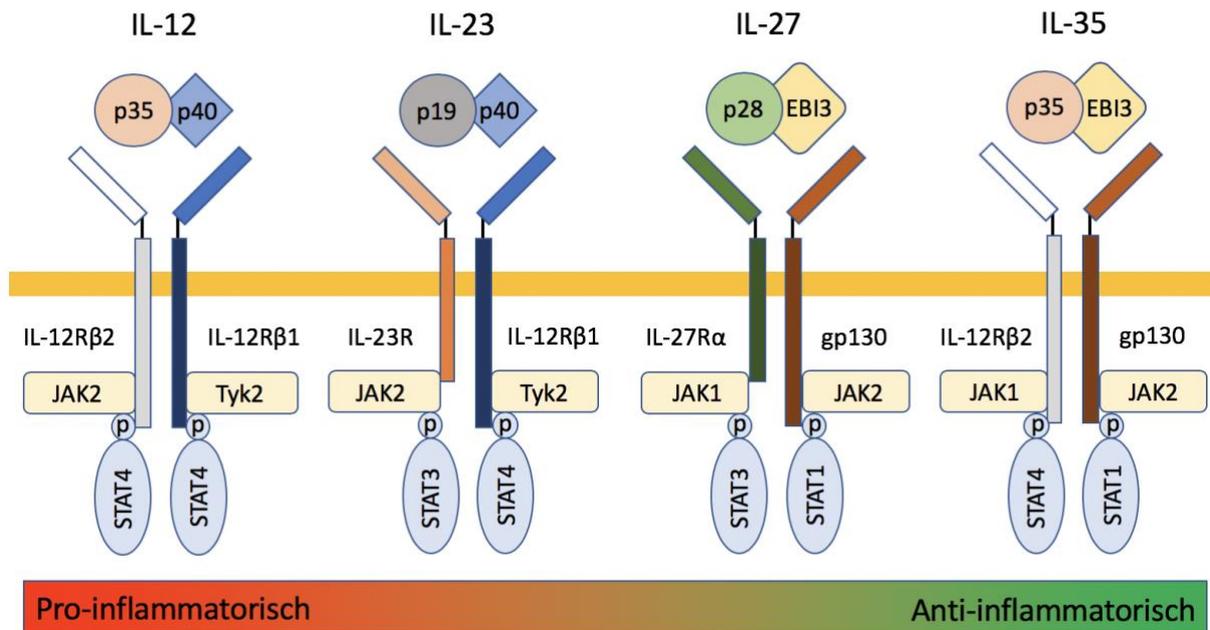


Abb. 3 IL-12 Zytokin-Familie. Mitglieder der IL-12-Familie werden zusammen mit ihren Rezeptoren und deren Jak-STAT-Signalisierungspartner präsentiert. Proinflammatorisch wirken IL-12/23. IL-27 wirkt pro- und antiinflammatorisch. IL-35 wirkt antiinflammatorisch. Tyk2 = Kinase der Jak-Familie. [51]

Jedes Mitglied besteht aus einer α -Kette (p19, p28 oder p35) und einer β -Kette (p40 oder EBI3), deren Expression unabhängig reguliert wird. Die α -Ketten enthalten eine Vierhelixbündelstruktur, während die β -Ketten strukturelle Merkmale von löslichen Klasse-I-Zytokinrezeptorketten aufweisen. IL-12 ist ein Heterodimer aus einer p35- und p40-Kette [52]. IL-23 ist ein Heterodimer, das die gleiche p40-Kette enthält, gepaart mit p19 [53]. Sowohl IL-12 als auch IL-23 sind proinflammatorische Zytokine. IL-12, das von APCs als Antwort auf mikrobielle Pathogene produziert wird, induziert die INF- γ -Sekretion durch T-Zellen, was die IL-12-Produktion und T-Helfer-1 (Th1) Differenzierung weiter stimuliert. In ähnlicher Weise wird IL-23 als Reaktion auf mikrobielle Pathogene induziert. Im Gegensatz zu IL-12 stabilisiert IL-23 die IL-17-Produktion und Differenzierung von T-Zellen zu einem T-Helfer-17 (Th17)

Phänotyp. IL-27 ist ein Heterodimer der p28-Kette und des Epstein-Barr-Virus-induzierten Gens 3 (EBI3) und scheint sowohl proinflammatorische als auch regulatorische Funktionen aufzuweisen [54]. Hingegen hat IL-35, das aus p35 und EBI3 besteht, hauptsächlich streng regulatorische Funktionen [55]. Daher bietet IL-35 ein einzigartiges Ziel für Therapien zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen. Im Jahr 2007 erstmals identifiziert, wird die IL-35-Sekretion durch Interferon (IFN) γ und Agonisten des Toll-like-Rezeptors (TLR) 3 und TLR4 induziert [56, 57]. Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der IL-12-Familie wird IL-35 hauptsächlich von regulatorischen T-Zellen (Tregs) produziert [55], wobei bei Mäusen auch aktivierte B-Zellen und in geringerem Ausmaß aktivierte Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Monozyten an der Produktion beteiligt sind [47, 58-60]. Interessanterweise kann IL-35 wiederum die Bildung von IL-35-kompetenten Treg-Zellen in Mäusen und Menschen induzieren und damit die IL-35-Antwort verstärken (sog. iTr35-Zellen) [61]. Im Gegensatz zur proinflammatorischen Wirkung anderer Zytokine der IL-12-Familie (IL-12, IL-23) inhibiert IL-35 CD4⁺-T-Zellen, einschließlich Th1- und Th17-Zellen, durch die Expansion von Treg-Zellen und IL-10 Produktion. Nach Bindung von IL-35 an seinen Rezeptor, erfolgt die Signaltransduktion durch Aktivierung von Mitgliedern der Janus-Kinase (JAK) -Familie. Die JAK-Autophosphorylierung induziert weitere Phosphorylierung und nukleäre Translokation von Mitgliedern der STAT-Familie (engl. *Signal Transducers and Activators of Transcription*) wie STAT1 und STAT4, die an verschiedene Stellen an den Promotoren von p35- und EBI3-Genen binden, was die IL-35-Expression induziert [62]. Untersuchungen von rekombinantem IL-35 (rIL-35), einem einzelkettigen Fusionsprotein von murinem p35 und EBI3, unterstützen weiterhin seine supprimierenden Effekte auf die T-Zell-Proliferation und Th17-Differenzierung [58, 63]. Bei der experimentellen Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE), dem Tiermodell der Multiplen Sklerose (MS), ist B-Zell-stammendes IL-35 zur Remission nötig [47]. CD138⁺ Plasmazellen wurden als Hauptproduzenten von IL-35 identifiziert und die IL-35-Sekretion wurde bei der Aktivierung über CD40 und TLR4 [47] induziert. Es bleibt jedoch herauszufinden, ob menschliche B-Zellen ebenfalls in der Lage sind, IL-35 zu produzieren und zu bestimmen, welche B-Zell-Untergruppen IL-35 produzieren können.

1.6 Multiple Sklerose

1.6.1 Klinik und Diagnose

Multiple Sklerose (MS) ist primär eine entzündliche Erkrankung des Gehirns und des Rückenmarks, bei der eine fokale lymphozytäre Infiltration zur Schädigung von Myelin und Axonen führt [64]. Etwa 2,5 Millionen Menschen sind weltweit von Multipler Sklerose betroffen, davon unter jungen Erwachsenen zum größten Anteil Frauen [65]. Zu den Symptomen gehören Sensibilitätsstörungen, Paresen, Sehstörungen, Störungen der Blasenkontrolle, Koordinationsstörungen, kognitive und psychiatrische Symptomen, Fatigue und Schmerzen. Der Krankheitsverlauf und die Symptomatik der Multiplen Sklerose sind jedoch heterogen. Die Charakterisierung des Erkrankungsverlaufes erlaubt es die Patienten in verschiedene Krankheitstypen zu kategorisieren. Das klinisch isolierte Syndrom (CIS) ist dabei die erste Manifestation einer möglichen Multiplen Sklerose. Die häufigste Form, die etwa 85% der Patienten betrifft, ist die schubförmig remittierende Multiple Sklerose (RRMS= *relapsing remitting MS*). Sie ist durch Episoden neurologischer Dysfunktion gekennzeichnet, gefolgt von einer Remissionsphase der klinischen Genesung und dann wiederkehrenden Anfällen mit Rückfall und Remission. Rückfälle fallen zusammen mit Entzündung und Demyelinisierung des ZNS, die typischerweise als Läsionen der weißen Substanz in der kraniellen Kernspintomografie erkennbar sind. Während die Verbesserung der Symptomatik bei jeder Remission sinkt und die Behinderung steigt, entwickeln etwa 80% der Patienten ein bis zwei Jahrzehnte nach Diagnosestellung eine sekundär progressive Multiple Sklerose. Bei sekundär progredienter Erkrankung ist ein progressiver neurologischer Verfall mit morphologisch sichtbarer ZNS-Atrophie charakteristisch, die durch verringertes Hirnvolumen und axonalem Verlust gekennzeichnet ist. Etwa 10% der Patienten mit Multipler Sklerose werden mit primär progressiver Erkrankung (PPMS) diagnostiziert, die von Anfang an progressiv und frei von Rückfällen ist [66].

1.6.2 Pathogenese

Die genaue Ätiologie der MS bleibt immer noch schwer fassbar. Es wird jedoch angenommen, dass die Krankheit bei genetisch anfälligen Individuen auftritt, wobei stochastische Ereignisse und Umweltfaktoren die Krankheitsentstehung beeinflussen. Ein lang etablierter Risikofaktor ist das humane Leukozyten-Antigen (HLA) Immun-Gen-Cluster [67]. Genom weite Assoziationsstudien haben 110 zusätzliche Nicht-HLA-Risiko-Gene festgestellt, die zusammen mit HLA-Effekten die MS-Konkordanz von 28% bei Geschwistern erklären [68]. Bezüglich der Umweltfaktoren wird der Sonnenexposition/Vitamin D-Spiegel, einer Infektion mit

Epstein-Barr-Virus (EBV) und Zigarettenrauchen [69] eine Rolle bei der Ätiologie der MS zugeschrieben. Studien an Tiermodellen schlagen auch eine Rolle des Darmmikrobioms [70] und eine erhöhte Salzaufnahme [71] vor. Es ist unklar, ob die MS in der Peripherie oder im ZNS ausgelöst wird. Im ZNS-extrinsischen (peripheren) Modell agieren autoreaktive T-Zellen, die an peripheren Stellen aktiviert werden. Möglicherweise wird dieser Prozess durch molekulares Mimikry [72], Antigen-unabhängige CD8+-T-Zellaktivierung (sog. Bystander-Aktivierung durch in der Umgebung produzierte Zytokine) oder durch Koexpression von T-Zell-Rezeptoren (TCRs) mit unterschiedlichen ZNS Spezifitäten verursacht [73]. Dieses Modell steht im Einklang mit der Methode, mit der die experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis (EAE) bei Tieren induziert wird: Emulgiertes ZNS-Antigen wird zusammen mit Immunstimulantien verabreicht, welche zur Bildung von pathogenem CD4+ Th1-Zellen und Th17-Zellen in den drainierenden Lymphknoten führt. Diese Zellen treten dann in den Kreislauf ein und üben, nachdem sie die Blut-Hirn-Schranke oder die Blut-Liquor-Barriere (CSF) am Plexus choroideus überschritten haben, ihre Effektorfunktionen schließlich im ZNS aus. Alternativ können ZNS-intrinsische Ereignisse die Entwicklung von Krankheiten auslösen, wobei die Infiltration von autoreaktiven Lymphozyten als sekundäres Phänomen auftritt. Es ist unklar, was diese ZNS-intrinsischen Ereignisse sein können, obwohl postulierte Mechanismen entzündliche Reaktionen auf eine noch unbekannte ZNS-Virusinfektion beinhalten [74]. Ebenso können Prozesse beteiligt sein, die zur primären Neurodegeneration führen, ähnlich denen, die mit der Alzheimer-Krankheit oder der Parkinson-Krankheit in Verbindung gebracht werden [75]. Die Suche nach Hinweisen für die Richtigkeit eines der Modelle erfordert jedoch eine genaue Analyse bekannter MS-Risikofaktoren und den Vergleich mit anderen Autoimmun- und neurodegenerativen Erkrankungen.

Neben T-Zellen müssen in der Pathogenese der MS die Rollen der B-Zellen und der Antikörper hervorgehoben werden. Ein Kennzeichen von MS-Patienten ist das Vorhandensein von Liquor-spezifischem oligoklonalem IgG-Banden (OCBs). Hierbei handelt es sich um Immunglobuline (IgG), die mithilfe der isoelektrischen Fokussierung, bei der sie sich zu charakteristischen Banden zusammenlagern, nachgewiesen werden können. OCBs sind positiv, wenn sie im Liquor, nicht aber im Serum nachweisbar sind. Sie sind in rund 95% bei MS-Patienten vorhanden und entstehen durch klonal expandierte Ig-sezernierende B-Zellen [76]. Diese B-Zellen werden hauptsächlich im Hirnparenchym, Hirnhäuten und Liquor gefunden [77-79], wobei sich interessanterweise das Transkriptom der CSF-B-Zellen mit dem Proteom der OCBs überlappt, was die Annahme bestätigt, dass intrathekale B-Zellen die Produzenten der OCBs

sind [80]. Außerdem ist bei 80-100% der MS-Patienten eine polyspezifische intrathekale humorale Immunantwort gegen eine breite Palette von viralen Antigenen zu finden. Dazu gehören Masern, Röteln und Varizellazoster Virus. Diese wird als sogenannte "MRZ-Reaktion" bezeichnet [81] und ist bei Nachweisbarkeit spezifischer für Multiple Sklerose als das Vorhandensein von OCBs [76]. In sekundär progressiver MS treten follikelartige Aggregate in den Hirnhäuten auf, die B-, T-, Plasmazellen und follikuläre dendritische Zellen enthalten und in denen CXCL13 nachweisbar ist [82]. Diese Erscheinung spricht für eine Antigen-gesteuerte B-Zell-Antwort im ZNS. Interessanterweise bleibt die intrathekale Antikörper-Antwort bestehen, selbst wenn eine immunmodulatorische oder immunsuppressive Behandlung begonnen wurde [83]. Der Grund dafür liegt bei der MS in einem ZNS-Milieu, in dem langlebige Plasmazellen überleben können. Dieser Umstand ist zurückzuführen auf die Produktion von BAFF (engl. *B Cell Activating Factor of the TNF-Family*) [84] durch Astrozyten und die Sekretion von CXCL13 [85], welche beide eine B-Zell-fördernde Mikroumgebung erzeugen. Die Rolle der B-Zellen in der Therapie der MS wird durch die Effektivität des Plasmaaustausches, sowie des B-Zell-depletierenden Antikörpers Rituximab bestärkt [86]. Ebenso besteht eine innige Verbindung zwischen klonal verwandten B-Zell-Repertoires auf beiden Seiten der Blut-Hirn-Schranke [87]. Das eigentliche Ziel pathogener Antikörper bleibt ein Schwerpunkt aktueller Forschung. Bislang wurde kein pathognomonischer Autoantikörper bei erwachsenen MS-Patienten identifiziert. Derzeit bereits untersuchte Antigene sind Myelin-Oligodendrozyten-Glycoprotein (MOG) [88], axo-gliale Antigene um den Ranvier-Knoten (Neurofascin, Contactin-2) [89], KIR4.1 [90] und andere [91].

1.6.3 Therapie

MS ist bis heute nicht heilbar. Die aktuelle medikamentöse Therapie richtet sich in erster Linie auf die Reduzierung der Krankheitsschübe und der zentralnervösen Läsionen mit dem Ziel des Erhalts der Lebensqualität und Verlangsamung des Krankheitsverlaufs. Verschiedene pharmakologische Ansatzpunkte wurden in den letzten Jahrzehnten stetig verbessert, die für die Behandlung des akuten Schubs, sowie die immunmodulierende Langzeittherapie indiziert sind. Im Folgenden wird auf die für diese Dissertation relevanten Medikamente Rituximab und Fingolimod eingegangen.

1.6.3.1 Rituximab

Therapeutische Antikörper finden zunehmend einen Stellenwert in der Behandlung der MS. Zum Teil finden sie aufgrund ihrer Wirksamkeit in verschiedenen Zentren bereits als Off-Label-

Therapie Verwendung. Ein Beispiel ist Rituximab, der als chimärer monoklonaler Antikörper CD20+ -B-Zelllinien in Blut, CSF und Gewebe depletiert [92]. CD20 beginnt auf prä-B-Zellen exprimiert zu werden und ist in allen Reifungsstadien vorhanden. Jedoch verschwindet es während der Plasmazell-Differenzierung. Aktuell ist Rituximab indiziert bei rheumatischer Arthritis und Erkrankungen der hämatologischen Onkologie. Für die Behandlung der MS besteht keine Zulassung in Europa. Rituximab depletiert CD20+ B-Zellen schnell aus dem Blutkreislauf, wohingegen die Depletion in Lymphknoten und Milz langsamer und weniger vollständig verläuft und diese sich zwischen B-Zell-Untergruppen unterscheidet [93]. Diese Unterschiede lassen sich nicht allein durch fehlende CD20-Expression, Gewebepenetration und Bioverfügbarkeit von Anti-CD20-Antikörpern oder von B-Zell-intrinsischen Faktoren erklären, sondern sind wahrscheinlich zumindest teilweise durch Überlebenssignalen der Umgebung bedingt [93]. Da langlebige Immunglobulin-sezernierende Plasmazellen jedoch CD20-negativ sind, werden diese nicht depletiert. Diese Tatsache ist entscheidend, da die Effekte von Rituximab auf Autoantikörper komplex sind: Rituximab kann nur minimal bereits vorhandenes zirkulierendes Gesamt-IgG reduzieren [94, 95], ebenso reduzierte es den Spiegel von Antikörpern bei einigen, jedoch nicht bei allen NMO- [96], rheumatoide Arthritis- oder systemischer Lupus erythematoses (SLE)-Patienten [94, 95]. In MS wurden vielen Studien bei Patienten mit RRMS durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl zerebrale Läsionen in der T2-Kernspintomografie-Gewichtung und Schubrezidive bei hoher Verträglichkeit sowie geringem Risiko für schwerwiegende opportunistische Infektionen oder sekundären Malignomen reduziert werden können [92, 97, 98]. Obwohl Rituximab bei den meisten Patienten einen effektiven und relativ sicheren therapeutischen Effekt vorweist, kann die B-Zell-Depletion auch mit proinflammatorischer Aktivität assoziiert sein. In einem in vitro EAE-Modell konnte gezeigt werden, dass eine Anti-CD20 Gabe sogar die Erkrankung exazerbieren kann [99]. Die Entzündungsreaktion könnte durch Depletion von regulatorischen B-Zellen verursacht sein, die IL-10 und andere inhibitorische Zytokine sezernieren [99]. In einer Phase-3-Studie wurde über einen Fall von progressiver multifokaler Leukoenzephalopathie (PML) in Verbindung mit Rituximab bei einem Patienten mit rheumatoider Arthritis und Sjögren-Syndrom berichtet [100]. Trotz des niedrigen, aber realen Risikos müssen weitere Studien zum PML-Risiko unter Rituximab geführt werden. Bisher konnte in einer der größten retrospektiven Beobachtungsstudie kein Fall von PML bei Rituximab-behandelten MS-Patienten berichtet werden, obwohl 83,3% der Patienten einen positiven JC-Virus-Serostatus zeigten [101]. Für PPMS und SPMS fehlt derzeit eine valide Evidenzgrundlage für die Empfehlung einer Rituximab-Behandlung, sodass derzeit laut Leitlinie diese als off-label in der

Eskalationstherapie der Schubprophylaxe der RRMS eingeordnet wird. Ähnlich wie Rituximab handelt es sich bei Ocrelizumab um einen gegen CD20-positive B-Lymphozyten gerichteten depletierenden Antikörper, der allerdings humanisiert ist. Ocrelizumab ist seit 2018 von der FDA (Food and Drug Administration) und den europäischen Gesundheitsbehörden (European Medicines Agency) zur Behandlung von MS zugelassen und ist das erste Medikament, das sowohl für RRMS als auch für PPMS vermarktet wird. Aufgrund der humanisierten Struktur und des geringfügig abweichenden Wirkmechanismus wird bei gleicher Wirksamkeit eine bessere Verträglichkeit als bei Rituximab postuliert [102].

1.6.3.2 Fingolimod

B-Zellen zirkulieren in Blut und Lymphe und rezirkulieren in sekundären lymphatischen Organen wie Milz, Lymphknoten, Tonsillen, Peyer-Plaques und Schleimhautgewebe. Eine Reihe von Adhäsionsmolekülen und das Zusammenspiel von verschiedener G-Proteingekoppelter Rezeptoren regulieren das Zurückkehren („Homing“) zu den B-Zell-Follikeln, sowie die Bildung von Keimzentren und schließlich den Austritt aus den Geweben zurück in den Kreislauf. Sphingosin-1-phosphat (S1P) S1P ist ein multipotenter Lipidmediator, der von vaskulären Endothelzellen [103], Plättchen [104] und Erythrozyten [105] synthetisiert wird. S1P-Rezeptoren sind membrangebundene Zelloberflächenrezeptoren [106]. Dabei werden die S1P-Rezeptoren-1-3 in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, während S1P-4 ausschließlich auf lymphoiden und hämatopoetischen Geweben und S1P-5 hauptsächlich im ZNS exprimiert wird [107, 108].

FTY720 (Fingolimod) ist ein Sphingosin-1-Phosphat (S1P) -Rezeptor-Modulator [109]. Der Wirkungsmechanismus geht primär auf eine zelluläre Internalisierung des S1P-Rezeptors nach Rezeptorbindung zurück, was zu einer anhaltenden Herunterregulation des Rezeptors auf Genexpressionsebene führt [110-113]. Physiologischerweise ziehen hohe S1P-Konzentrationen in Blut und Lymphe B-Zellen an und induzieren ihren Austritt aus lymphatischen Geweben, wo die S1P-Konzentrationen niedrig sind [114]. Die therapeutische Wirkung von FTY720 bei MS beruht dementsprechend auf einem verringerten Austritt von Immunzellen aus dem lymphatischen Gewebe und auf andere lokale Effekte im ZNS [115, 116]. Mausmodelle mit deletierten S1P-Rezeptorgenen haben die Relevanz des S1P-Rezeptors für den Austritt unreifer B-Zellen aus dem Knochenmark gezeigt [117]. Diese S1P-Rezeptor-1-Knockout-Mäuse weisen weniger zirkulierende transitionale B-Zellen auf, während die Anzahl an naiven B-Zellen im Knochenmark erhöht ist [118]. Im klinischen Bild zeigt sich bei FTY720-behandelten MS-Patienten die T-Zell- und B-Zell-Zahlen im Blutkreislauf verringert

[116] und die CSF-Zellzahl im Liquor normalisiert [119]. Auf Ebene der lymphatischen Organen wurde eine erhöhte B-Zelldichte in den B-Zellfollikeln und eine Verdrängung der B-Zellen in T-Zell-Bereiche beobachtet [120]. Da die physiologische Migration von marginalen B-Zellen, die zwischen der marginalen Zone und dem Follikelbereich hin- und zurückwandern, durch S1P-Hemmung unterbunden wird, ist zugleich der Antigentransport verhindert [121]. Diese Effekte führen zu reduzierte Keimzentrums-Reaktionen und verringerte Produktion von hochaffinen klassen-gewechselten Antikörpern (jedoch nicht von niedrig-affinen oder T-Zell-unabhängigen Antikörpern) [122].

Die obig genannten Wirkungen von Fingolimod bei MS-Patienten beruhen zusammenfassend auf indirekte Effekte durch Inhibition von Immunzell-Infiltration ins ZNS. Fingolimod kann jedoch die Blut-Hirn-Schranke überwinden und biologisch relevante ZNS-Konzentrationen erreichen. Durch die Interaktion mit Rezeptoren auf Neuronen und Glia wird eine direkte neuroregenerative Wirkung in Zusammenhang mit einer Fingolimod-Behandlung postuliert [123]. Fingolimod moduliert eine Vielzahl von intrazellulären Signalwegen in Oligodendrozyten und Astrozyten durch S1P1-, S1P3- und S1P5-Rezeptoren [124, 125] Durch S1P3- und S1P5-Rezeptor-Signalisierung wird das Überleben der oligodendroglialen Zellen verbessert und die Differenzierung von Oligodendrozyten Vorläufer Zellen (OPCs) stimuliert [126]. In Kombination mit Neurotrophin-3 scheint Fingolimod die Verzweigung oligodendroglialer Prozesse zusätzlich zu stimulieren [127].

Zwei ausschlaggebende Studien von Fingolimod wurden bei Patienten mit RRMS durchgeführt. Eine 12-monatige Studie, TRANSFORMS (Studie zur Beurteilung von injizierbarem Interferon versus oralen FTY720 bei rezidivierend-remittierender Multipler Sklerose) verglich Fingolimod (0,5 mg und 1,25 mg) mit Interferon beta-1a [128, 129], und die 24-monatige FREEDOMS Studie verglich Fingolimod (0,5 mg und 1,25 mg) mit Placebo [130]. Die jährlichen Schubraten waren in beiden Fingolimod-Behandlungsgruppen signifikant niedriger (-0,16 für 0,5 mg und 0,20 für 1,25 mg) verglichen mit der Interferon-Gruppe (0,33; $p < 0,001$ für beide Vergleiche) [128-130]. Zu den typischen Nebenwirkungen von Fingolimod gehören Lymphopenie, Atemwegsinfektionen und vorübergehende Bradykardie. Der kausale Zusammenhang und mögliche Dosisabhängigkeit zwischen Fingolimod-Verabreichung und weiteren Nebenwirkungen, wie Makulaödem, Hautkrebs und Reaktivierung von latenter Herpes-Virus-Infektion bleibt zu etablieren.

Fingolimod ist in Deutschland in erster Linie zur krankheitsmodifizierenden Monotherapie der hochaktiven, schubförmig remittierend verlaufenden Multiplen Sklerose (RRMS) zugelassen.

1.7 Zielsetzung

Obwohl bezüglich der Effektorfunktionen und des Phänotyps IL-10-produzierender B-Zellen (B10-Zellen) zunehmender Konsens herrscht, besteht weiterhin Uneinigkeit in der Rolle IL-35-produzierender B-Zellen (B35-Zellen). Bis heute wurde IL-35 als neu entdecktes regulatorisches Zytokin in verschiedenen Maus-Versuchsmodellen erforscht, und B- und T-Zellen für die Produktion verantwortlich gemacht. Im humanen Immunsystem konnte die Fähigkeit zur IL-35 Produktion bei T-Zellen festgestellt werden; eine analoge Fähigkeit der B-Zellen fehlt jedoch bis heute. In dieser Arbeit soll gezeigt werden, dass humane B-Zellen ebenso in der Lage sind IL-35 zu produzieren. Weiterhin soll die Generierung dieser B35-Zellen unter optimalen Stimulationsbedingungen dargestellt werden. Hinsichtlich des Phänotyps wurden bereits bei Mäusen mehrere B35-Zell-Untergruppen beschrieben. Diese Ergebnisse dienen in der folgenden Dissertation als Grundlage für die Untersuchung menschlicher B-Zellen. Wichtig sind hierbei der Vergleich zu B10 Zellen und die Frage nach Überlappungen im B35- und B10-Zell-Phänotyp. Zur Untersuchung der klinischen Relevanz von IL-35 dient eine Analyse der Serum- und Plasmawerte von IL-35 in Korrelation zur MS-Krankheitsaktivität. Weiterhin soll mit Fingolimod als eine der Therapiemöglichkeiten der MS ein Zusammenhang mit Bregs hergestellt werden, indem eine direkte in-vitro Stimulation der Bregs durch Fingolimod analysiert wird. Ebenso werden in klinischer Fragestellung Fingolimod und Rituximab behandelte Patienten auf Ihre IL-35 Plasmawerte untersucht.

Ziel dieser Arbeit soll somit das bessere Verständnis regulatorischer B Zellen sein, insbesondere in Hinblick auf die Phänotypisierung und Regulation von B35-Zellen und deren Gegenüberstellung mit B10-Zellen. Eine klinische Analyse bringt Einblick in die Bedeutung von IL-35 bei MS.

2 Material

2.1 Lösungen

FACS Puffer	PBS + 1% BSA
RPMI Complete	RPMI + 10% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin + 1% Glutamin + 1% Sodium Pyruvat + 1% NEAA
MACS Puffer	PBS pH 7,2 + 0,5% BSA + 2mM EDTA
CD40L Medium	DMEM + 10% FCS + 1% PenStrep + 4,8 mg/mL G418

2.2 Chemikalien

PBS	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Pancoll	Pan Biotech, Aidenbach (GER)
RPMI	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
DMEM	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
FCS	Biochrom GmbH (Deutschland)
Glutamin	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Sodium Pyruvat	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
NEAA	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Pen Strep (Penicillin Streptomycin)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
G418 100mg/mL	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
BSA	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
EDTA	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
Aqua dest	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Substrate Reagent Pack	Bio-Techne, Minneapolis (USA)
H ₂ SO ₄	Roth GmbH (Deutschland)
Permeabilization Buffer (10X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Fix/Permeabilization Diluent	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Fixation/Permeabilization concentrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Trypanblau	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
RLT Puffer	QIAGEN (Deutschland)
Ethanol	Merck Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
AmpliTaQ Gold DNS Polymerase	Applied Biosystems (USA)

Uracil-N-glycosylase (UNG)

Applied Biosystems (USA)

IL-10 FAM Taqman

Applied Biosystems (USA)

2.3 Geräte

Pipettierhelfer accujet-Jet pro

Brand GmbH (Deutschland)

Bucket Zentrifuge Heraeus Multifuge

Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

ELISA Multifold Dispenser

Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

Tripod Shaker (ELISA) Rocky 3D

Fröbel Labortechnik GmbH (Deutschland)

Vortex Genie 2

Scientific Industries Inc. (USA)

ELISA Microplate Reader Victor2

PerkinElmer, Waltham (USA)

Inkubator

Heraeus, Hanau

Feinmesswaage Delta Range PB3002

Mettler-Toledo (USA)

Kühlschrank (-20°C und 4 °C)

Liebherr, Bulle (Schweiz)

Gefriertruhe (-80 °C)

Liebherr, Bulle (Schweiz)

Mikroskop

Helmut Hund GmbH (Deutschland)

Neubauer Zählkammer

Karl Hecht GmbH & Co KG (Deutschland)

BD FACSVerser

Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)

Eppendorf Tubes Zentrifuge

Eppendorf, Hamburg

Pipetten

Eppendorf, Hamburg

Easysep Magnet

STEMCELL Technologies, Vancouver (Canada)

MACS Separator

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Nanodrop

Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

Thermal Cycler Mastercycler Gradient

Eppendorf, Hamburg

Sterilwerkbank

Heraeus, Hanau

2.4 Kits

EasySep Human B Cell Enrichment Kit

STEMCELL Technologies, Vancouver (Canada)

CD38 MicroBeads Kit

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

CD138 MicroBeads Kit

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

ELISA Kit for human Interleukin 35

Cloud-Clone Corp., Wuhan (VR China)

Human IL-10 DuoSet

R&D Systems, Minneapolis (USA)

Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set

Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

RNeasy Mini Kit

QIAGEN, Venlo (Niederlande)

qPCR Core Kit

Eurogentec, Seraing (Belgien)

2.5 Zellstimulantien

Peptidoglycan	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
poly(I:C)	Amersham Pharmacia Biotech, Amersham (UK)
LPS	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
Flagellin	ibt Systems GmbH, Ertingen
CpG B ODN 2006	InvivoGen, San Diego (USA)
R848	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
PMA	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
Ionomycin	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
Fingolimod FTY-P	Echelon Biosciences, Salt Lake City (USA)
Monensin GolgiStop™	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)

2.6 Verbrauchsmaterialien

ELISA Folien	
Falcon <i>conical bottom</i> (15ml und 50ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)
Falcon <i>round bottom</i> 5ml polystyrene	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)
96 well <i>flat bottom</i> Mikrotiterplatte (50 µL und 100 µL)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
96 well <i>round bottom</i> Mikrotiterplatte	Corning (USA)
96 well <i>V-bottom</i> Mikrotiterplatte	Corning (USA)
96 well qPCR Platten	Corning (USA)
Zellkulturflaschen	Corning (USA)
Einmalpipetten Pipetboy	Corning (USA)
Pipettenspitzen Stripette	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Eppendorf tubes	Eppendorf, Hamburg
PCR tubes	Eppendorf, Hamburg
Nunc® CryoTubes® 1,5 mL	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
FACS tubes	Corning (USA)
MACS Trennsäulen (MS; LS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
FACS Kompensationsbeads	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)

2.7 Antikörper

2.7.1 Durchflusszytometrie: Oberflächenfärbung

Alle Antikörper sind Spezies spezifisch auf Anti-Human.

	Reaktivität	Fluorochrom	Host/Isotyp	Klon	Konzentration	Hersteller
	CD19	FITC	Mouse	HD37	5 µg/ml	DAKO
	CD38	eFluor® 450	Mouse IgG1 κ	HB7	0.6 µg/ml	eBioscience
	Isotyp Kontrolle	Horizon V450	Mouse IgG1 κ	MOPC-21	0.6 µg/ml	BD
	CD27	PE-Cy7	Mouse IgG1 κ	O323	2.5 µg/ml	eBioscience
	Isotyp Kontrolle	PE-Cy7	Mouse IgG1 κ	P3.6.2.8.1	2.5 µg/ml	eBioscience
	CD24	APC	Mouse IgG1 κ	eBioSN3	2.5 µg/ml	eBioscience
	Isotyp Kontrolle	APC	Mouse IgG1 κ	MOPC-21	2.5 µg/ml	BD
	CD19	PerCP	Mouse IgG1	4G7-2E3	5µL pro Well	R&D Systems
	Isotyp Kontrolle	PerCP	Mouse IgG1	X40	50 µg/ml	BD
	CD138	APC	Mouse IgG1	DL-101	1,25 µg/ml	eBioscience
	Isotyp Kontrolle	APC	Mouse IgG1 κ	MOPC-21	1,25 µg/ml	BD

Tabelle 2. Antikörper Oberflächenfärbung

2.7.2 Durchflusszytometrie: Intrazelluläre Färbung

Alle Antikörper sind Spezies spezifisch auf Anti-Human.

	Reaktivität	Fluorochrom	Host/Isotyp	Klon	Konzentration	Hersteller
	IL-10	PE	Mouse IgG1	JES3- 9D7	1.25 µg/ml	eBioscience
	Isotyp Kontrolle	PE	Mouse IgG1	X40	1.25 µg/ml	eBioscience
	IL-27 EB13	eFluor® 710	Mouse IgG2b, κ	ebic6	0.3 µg/ml	eBioscience
	Isotyp Kontrolle	PerCP	Mouse IgG2a, κ	X39	0.3 µg/ml	BD
	IL-12/IL-35 p35	PE	Mouse IgG1	27537	2.5 µg/ml	R&D Systems

<i>Isotyp Kontrolle</i>	PE	Mouse IgG1	X40	2.5 µg/ml	BD
<i>IL-27/IL-35 EB13</i>	Alexa Fluor 488	Mouse IgG1	607201	1 µg/ml	R&D Systems
<i>Isotyp Kontrolle</i>	FITC	Mouse IgG1	X40	1 µg/ml	BD
<i>IL-10</i>	Alexa Fluor 488	Rat IgG1 κ	JES3-9D7	1,25 µg/ml	eBioscience
<i>Isotyp Kontrolle</i>	FITC	Rat IgG1 κ	eBRG1	1,25 µg/ml	eBioscience

Tabelle 3. Antikörper intrazelluläre Färbung

2.8 Computersoftware

Microsoft Excel 2016

Microsoft Word 2016

Graphpad PRISM

FlowJo

BD FACSuite

SDS

Adobe Illustrator

2.9 Zelllinien

JK6L

CD40L L Zellen

3 Methoden

3.1 Zählmethode von Zellen

Die Bestimmung der Zelldichte (Zellen/ml) wird mithilfe der Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Zur Unterscheidung der lebenden von toten Zellen wird 1% Trypanblau benutzt. Trypanblau kann die Zellmembran toter Zellen durchdringen und diese blau färben, während lebende Zellen den Farbstoff ausschließen können und deshalb nicht gefärbt werden.

Für die Zellzählung wird eine Suspension mit Farbstoff von insgesamt 100 μL in einer *round-bottom* Mikrotiterplatte hergestellt. Die Relation des Farbstoffs zur Zellsuspension ist abhängig von der zu messenden Zelldichte. Bei hoher Zellzahl (z.B. beim Zählen von PBMCs) wird beispielsweise 2 μL Trypanblau benutzt und zu 98 μL Zellsuspension hinzupipettiert. Der Verdünnungsfaktor beträgt hier 1:50. Wird eine niedrige Zellzahl erwartet (z.B. beim Zählen von B Zellen) wird beispielsweise 10 μL Trypanblau zu 90 μL Zellsuspension hinzupipettiert. Der Verdünnungsfaktor beträgt hier 1:10. Nach ausreichendem Mischen der Suspension werden davon 10 μL in die Neubauer Zählkammer pipettiert. Unter 10 facher Vergrößerung werden 4 Großquadrate ausgezählt. Die Zelldichte berechnet sich nach folgender Formel:

Zellzahl/ml = gezählte Zellen im Großquadrat x Verdünnungsfaktor x 10.000/ml

3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen werden diese in der Zentrifuge bei 1600 rpm für 10 min und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wird in 1,5 ml Einfriermedium (90% FCS + 10% DMSO) aufgelöst und anschließend in 1,5 ml Cryotubes umgefüllt. Die Cryotubes werden in einem Styroporbehälter gestellt, der anschließend im -80 °C Gefrierschrank zum Einfrieren gelagert wird. Der Styroporbehälter dient zur langsamen Temperaturreduktion beim Einfrieren der Zellen. Zum Auftauen werden die Cryotubes möglichst schnell auf 4 °C gebracht. Dabei wird 50 mL des 4 °C geeigneten Medium in ein 50 mL Falcon umgefüllt und der Inhalt des 1,5 mL Cryotubes darin aufgelöst. Nach Zentrifugation bei 1600 rpm für 10 min und 4 °C kann das Pellet in Medium aufgelöst und unter dem Mikroskop mit Trypanblau gezählt werden.

3.3 Zellisolationen

3.3.1 Isolation von peripheren mononukleären Zellen im Blut

Die Isolation von peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) im Blut basiert auf dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation. Dabei wird Pancoll als Trennlösung benutzt. Von gesunden Spendern werden jeweils Blut in 9 mL EDTA Röhren abgenommen. EDTA dient zur Hemmung der Blutgerinnung. Die Anzahl der EDTA Röhren korreliert mit der abgezielten

PMBCs Zellanzahl, ist deshalb abhängig vom experimentellen Setting und beträgt für die folgenden Experimente 6 bis 12 EDTA Röhrrchen. Zwei EDTA Röhrrchen werden jeweils in einem 50 ml konischen Falcon-Röhrrchen gepoolt und 1:1 mit 18 ml PBS verdünnt. Parallel werden 15 ml Pancoll Lösung in einem 50 ml konischen Falcon-Röhrrchen abgefüllt. Mit einer Pipetboy Pipette wird vorsichtig das in PBS verdünnte Blut auf die Pancoll Lösung geschichtet ohne dass es zu einer Vermischung der Schichten kommt. Anschließend werden diese Falcon Röhrrchen bei 1600 rpm, 20 °C und ohne Bremsung („Dezeleration = 0“) für 30 min zentrifugiert. Nach Zentrifugation entsteht unter der obersten Plasmaschicht und über der Pancoll-Schicht eine weiße Schicht, die „Buffy Coat“ genannt wird. Diese Schicht enthält mononukleäre Zellen (Lymphozyten und Monozyten). Mit einer Pipetboy Pipette wird vorsichtig dieser Buffy Coat aspiriert und in zwei konischen Falcon-Röhrrchen übertragen. Da Pancoll als Störfaktor für die folgende Zellkultivierung agiert, ist dabei zu achten, dass möglichst wenig Pancoll Lösung aspiriert wird. Im nächsten Schritt werden die im Buffy Coat gewonnenen Zellen mit PBS gewaschen, um Verunreinigungen vor allem durch Pancoll Reste zu entfernen. Dabei werden die Falcons auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und bei 1600 rpm, 20 °C und angeschalteter Bremsung („Dezeleration = 9“) für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird in einem neuen 50 ml Falcon abgegossen und das Zell-Pellet in einem zweiten Waschschrift mit zunächst 1 ml PBS resuspendiert und auf 50 ml PBS aufgefüllt. Der Überstand und das resuspendierte Zell-Pellet werden wiederum bei 1600 rpm, 20 °C und angeschalteter Bremsung („Dezeleration = 9“) für 10 min zentrifugiert. Abschließend werden alle Zell-Pellets in einem Falcon gepoolt, wiederum mit PBS gewaschen und nach wiederholter Zentrifugation in 0,5 ml - 2 ml PBS resuspendiert und in einer Zählkammer gezählt.

3.3.2 Isolation von humanen B Zellen aus peripheren mononukleären Zellen

B-Zellen werden mittels „EasySep™ Human B Cell Enrichment Kit“ aus frischen PBMCs isoliert. Bei diesem Kit handelt es sich um eine negative Selektion, d.h. Nicht-B-Zellen werden durch Antikörper erkannt und magnetisch aussortiert. In der verbleibenden Lösung sind bis zu 99 Prozent aufgereinigte B Zellen zu finden. Das Kit besteht aus zwei Komponenten, einem *Human B Cell Enrichment Cocktail* und *D-Magnetic Particles*. Das Prinzip dieses Kits beruht darauf der Erkennung von Zell-Oberflächenantigene von Nicht-B-Zellen durch die im Cocktail zu findenden tetramerischen Antikörper-Komplexe (TAK) im ersten Schritt und im zweiten Schritt die Markierung dieser Verbindung mittels hinzugefügten Dextran-beschichteten *D-Magnetic Particles*. Die dadurch magnetisch gelabelten Zellen werden durch einen Magneten im Röhrrchen zurückgehalten, wobei B-Zellen in Lösung bleiben und in ein separates Röhrrchen abgekippt werden können. PBMCs müssen im ersten Schritt laut Hersteller möglichst eine

Konzentration von 5×10^7 Zellen/mL vorweisen. Dabei werden die isolierten PBMCs je nach aufgereinigter Zellanzahl in 0,5 ml bis 2 ml PBS verdünnt und einem 5 ml Polystyrene *round-bottom* Röhrchen umgefüllt, der passend für den geeigneten Purple EasySep™ Magneten ist. Zu dieser Zellsuspension wird 50 µL/mL Zellsuspension EasySep™ Human B Cell Enrichment Cocktail hinzugefügt (bei 2 ml Zellsuspension wird 100 µL des Cocktails hinzugefügt) und auf dem Vortex für 5 Sekunden durchmischt. Bei Raumtemperatur erfolgt eine Inkubation von 10 Minuten. Vor Anwendung der EasySep™ D-Magnetic Particles müssen diese für 30 Sekunden auf dem Vortex gemischt werden, damit sedimentierte Partikel in homogener Lösung treten und keine Aggregate bilden. Davon werden 75 µl/ml der Zellsuspension hinzugefügt (bei 2 mL Zellsuspension wird 150 µL der D-Magnetic Particles hinzugefügt), auf dem Vortex für 5 Sekunden durchmischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Volumen wird anschließend auf 2,5 ml mit RPMI-complete-Medium aufgefüllt und für 5 min in den Purple EasySep™ Magneten platziert. Danach wird das Röhrchen mitsamt Magneten genommen und die Zellsuspension in einem Schwung in ein neues 15 ml konisches Falcon Röhrchen umgefüllt. Nicht-B-Zellen haften im Magneten befindlichen Röhrchen. Die negativ selektierten B Zellen sind nun für die Zellkultur nutzbar. Zur Kontrolle wird stets ein Reinheits-FACS dieser B-Zell-Isolation mit CD19 gerichteten FACS Antikörper durchgeführt, um den Anteil von CD19⁺ an der Gesamtzahl der lebenden Zellen zu bestimmen.

3.4 Zellseparationen

Stimulierte B-Zellen werden für die Analyse in CD38 positive/negative und CD138 positive/negative Zellpopulationen separiert. Dazu werden von Miltenyi Biotec „MACS® Separation“ das „CD38 MicroBead Kit“ und das „CD138 MicroBead Kit“ verwendet.

3.4.1 Prinzip der Zellseparation mithilfe Miltenyi Biotec MACS® Separation

Das Prinzip dieser Kits beruht auf eine positive Selektion durch Markieren der B Zellen mit CD38-Biotin Antikörpern und magnetischen Anti-Biotin MicroBeads bzw. magnetischen Anti-CD138-MicroBeads. Nach Markierung wird die Zellsuspension in die MACS Säule überführt, die anschließend im magnetischen Feld des MACS Separators positioniert wird. Die magnetisch markierten CD38-positiven bzw. CD138-positiven Zellen werden in der Säule zurückgehalten, wobei nicht markierte Zellen durchfließen, die dementsprechend CD38-negativ bzw. CD138-negativ sind. Nach Entfernung der Säule aus dem Magneten, können die CD38-positiven bzw. CD138-positiven B Zellen aus der Säule ausgewaschen werden. Wichtig ist beim Arbeiten mit dem Kit, dass alle Schritte nahtlos und zügig geschehen und alle Materialien gekühlt (4 °C) sind.

3.4.2 Miltenyi Biotec MACS® Separation CD38 MicroBead Kit

Das Kit ist für eine Zellzahl von 1×10^7 Zellen ausgelegt. Für die doppelte Zellzahl muss die doppelte Menge an Reagenzien verwendet werden. Vor Beginn des Protokolls wird ein MACS Puffer hergestellt (siehe Materialteil 2.1). Nach Zählung der Zellzahl wird die Suspension bei $300 \times G$ für 10 min und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das Pellet wird in $80 \text{ }\mu\text{l}$ MACS Puffer resuspendiert und anschließend mit $20 \text{ }\mu\text{l}$ CD38 Biotin für 10 min bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Das Kit verlangt im nächsten Schritt nach einem Waschvorgang mit MACS Puffer (2 ml Puffer, 300 G, 10 min) noch eine Zugabe von Anti-Biotin MicroBeads ($20 \text{ }\mu\text{l}$, 15 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) Nach einem zweiten Waschvorgang (2 ml Puffer, 300 G, 10 min) wird das Pellet in $500 \text{ }\mu\text{l}$ MACS Puffer resuspendiert. Nun folgt die magnetische Separation. Die MACS Säule der Größe MS wird 1 Mal durchgewaschen mit $500 \text{ }\mu\text{l}$ MACS Puffer. Die zuvor vorbereitete Zellsuspension wird nun auf die Säule aufgeladen und danach 3 Mal mit $500 \text{ }\mu\text{l}$ MACS Puffer gewaschen. Der durchgeflossene Puffer enthält nun die nicht markierten Zellen. Im letzten Schritt werden die magnetisch zurückgehaltenen Zellen in der Säule mit 1 mL MACS Puffer durch forcierten Druck durchgespült. Dieses Auswaschen wird nochmals durch eine neue Säule mit den obig genannten Schritten aufgereinigt um die Reinheit der separierten Zellen zu erhöhen. Die separierten Zellen CD38 positiv/negativ sind nun bereit für die weitere Analyse. Um die Reinheit zu überprüfen, wird stets ein FACS (Durchflusszytometrie) mit einem Anti-Biotin-Antikörper (CD38 sind bereits während des Separierungsvorgangs mit Biotin Antikörpern des Kits besetzt) durchgeführt um den Anteil der CD38-positiven Zellen zu bestimmen.

3.4.3 Miltenyi Biotec MACS® Separation CD138 MicroBead Kit

Das Protokoll dieses Kits ist dem CD38 MicroBead Kit nahezu identisch. Der Unterschied ist die direkte Bindung des CD138 Antikörpers an die MicroBeads, anstatt über Biotin. Das Kit ist für eine Zellzahl von 2×10^7 ausgelegt. Nach Zählung der Zellzahl wird die Suspension bei 300 G für 10 min und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das Pellet wird in $80 \text{ }\mu\text{l}$ MACS Puffer resuspendiert und anschließend mit $20 \text{ }\mu\text{l}$ CD138 MicroBeads für 15 min (CD138) bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Nach einem Waschvorgang (2 ml Puffer, 300 G, 10 min) wird das Pellet in $500 \text{ }\mu\text{l}$ MACS Puffer resuspendiert. Nun folgt die magnetische Separation, wie unter 3.4.2 beschrieben.

3.5 Zellkultur

Die gewonnenen PBMCs und B Zellen werden in RPMI complete kultiviert. Zur Berechnung der ungefähren Blutentnahmemenge wird folgende vereinfachte Regel angenommen: Aus 1

EDTA Röhren können 8 Millionen PBMCs isoliert werden. Davon wiederum können 10 Prozent B-Zellen gewonnen werden. In dieser Regel ist bereits genügend Puffer einberechnet um genügend Zellen zu gewinnen, da zwischen den einzelnen Protokollschritten der Zellisolation Verluste auftreten. Der Brutschrank sollte 37°C sowie eine CO₂ Konzentration von 5% haben.

3.5.1 Stimulation von PBMCs mit Resiquimod (R848) und IL-2

Das Protokoll zur Stimulation von PBMCs mit R848 (TLR-Ligand 8/9) und IL-2 dient zur Differenzierung von B-Zellen zu Antikörper produzierenden Plasmazellen/Plasmablasten. Dabei wird eine 24 Well *flat-bottom* Platte benutzt, wobei pro Well 600.000 PBMCs in 1 ml RPMI complete gelöst wird. Die Konzentration der Stimulanzen beträgt für IL-2 1000 UI/ml und für R848 2,5 µl/ml.

3.5.2 Stimulation von B Zellen mit CD40L (=CD154)

CD40 gehört zur Klasse der Cluster of Differentiation (CD) Oberflächenmarker und ist ein Rezeptor auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden-Zellen (APCs). Nach Erkennung des von der B-Zelle präsentierenden Peptids durch eine aktivierte T-Zelle, bindet der CD40-Ligand der T-Zelle an den CD40-Rezeptor der B-Zelle, was eine B-Zellaktivierung bewirkt. Infolge dieser Kostimulation kann die B-Zelle einen Klassenwechsel des Antikörper-Isotyps und eine Differenzierung zu Plasmazellen erfahren. CD40 spielt daher eine wichtige Rolle in der Aktivierung der Immunantwort. Für die folgende Versuche werden CD40-Ligand (CD40L) exprimierende Maus L-Zellen verwendet. Dabei handelt es sich um maligne Maus-Embryo Fibroblasten, die CD40L exprimieren. Dieser Genlocus ist gekoppelt mit einem Widerstandsfähigkeitsgen gegen das Antibiotikum Geneticin (G418). Damit sind Maus L-Zellen ohne CD40L Expressierung empfänglich gegenüber dem Antibiotikum und werden abgetötet, was bei Zugabe von Geneticin in einer hohen Reinheit CD40L exprimierender Zellen resultiert. CD40L exprimierende Maus L-Zellen werden in 20 ml DMEM mit 10% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin (PenStrep) und 4,8 mg/mL des Antibiotikums Geneticin (G418) im Brutschrank kultiviert. Vor Zugabe der B-Zellen müssen diese Zellen bestrahlt werden, um das weitere Wachstum dieser L-Zellen zu verhindern. Ebenso sind sie in ihrer weiteren Eigenschaft adhärenz Zellen. Nach Absaugen des Mediums und Spülung mit 20 ml PBS werden die Zellen mit 2 ml Trypsin für 2 min im Brutschrank inkubiert. Trypsin löst die adhärenz Zellen von der Unterfläche ab. Zur Inaktivierung des Trypsins wird anschließend 10 mL DMEM mit 10% FCS und 1% PenStrep hinzugegeben. Die Zellsuspension wird in ein 15 ml konisches Falcon-Röhrchen übertragen und bei 1200 rpm, 4 °C und für 7 min zentrifugiert. Parallel wird frisches

Medium mit Antibiotikum hergestellt: Zu 20 ml DMEM mit 10% FCS, 1% Pen Strep wird 960 µL Geneticin (G418) Antibiotikum (Stock-Konzentration 100mg/mL) hinzugefügt, sodass das Antibiotikum eine Konzentration von 4,8 mg/mL erreicht. Der Überstand wird nach Zentrifugation abgegossen, das Pellet wird in 1 mL DMEM mit 10% FCS, 1% PenStrep aufgelöst und davon 20 µL separat in 10 ml DMEM mit 10% FCS, 1% PenStrep in ein 15 ml Falcon-Röhrchen übertragen (1:50 Aufteilung). Dieser Anteil wird bei 72,5 Gy für 15 min bestrahlt und ist danach bereit zur Verwendung. Der restliche Anteil wird mit 20 mL frischen Medium (siehe oben mit Antibiotikum) aufgefüllt, in eine neue Brutflasche übertragen und im Brutschrank in Kultur gehalten.

Für die Stimulation mit CD40L wird eine 96 Well *flat bottom* Platte benutzt. 5000 CD40L-Zellen werden pro Well benötigt, die aufgelöst sind in 100 µL DMEM mit 10% FCS, 1% PenStrep. Es muss darauf geachtet werden, dass für ein Kontroll-Well ebenso 100 µL DMEM mit 10% FCS, 1% PenStrep ohne CD40L Zellen benutzt wird.

3.5.3 Stimulation von B-Zellen mit TLR Liganden

TLR Liganden können in Kostimulation mit CD40L oder ohne CD40L für B-Zell Stimulation verwendet werden. Zur Stimulation von B Zellen mit TLR Agonisten wird eine 96 well *flat bottom* Platte benutzt, wobei pro well 120.000 B Zellen in 50 µL RPMI complete aufgelöst sind. Dazu werden wahlweise 5000 CD40L-Zellen in 50 µL DMEM mit 10% FCS, 1% PenStrep (CD40L Kokultivation) oder nur 50 µL DMEM mit 10% FCS, 1% PenStrep ohne CD40L-Zellen hinzugefügt.

Für die Stimulation werden folgende TLR Liganden in den aufgeführten Konzentrationen benutzt: TLR-2 Ligand: Peptidoglycan (10 µL/mL, Sigma Aldrich), TLR-3 Ligand: poly(I:C) (25 µL/mL, Amersham Pharmacia Biotech Inc), TLR-4 Ligand: LPS (2 µL/mL, Sigma-Aldrich), TLR-5 Ligand: Flagellin (5 µL/mL, ibt GmbH), TLR-7/8 Ligand: R848 (1 µg/ml, Sigma-Aldrich), TLR-9 Ligand: CpG B ODN 2006 (2.5 µg/ml, Invivogen).

Um das Signal der Analyse im Durchflusszytometer oder im ELISA zu erhöhen werden die Zellen in den letzten 4 h (wenn eine intrazelluläre FACS Färbung folgt) bzw. 5 h (wenn eine Analyse des Überstands mit ELISA folgt) mit PMA (50 ng/mL, Sigma Aldrich) und Ionomycin (1 µg/mL, Sigma-Aldrich) behandelt. PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) ist eine kleinmolekulare organische Verbindung, die durch die Zellmembran in das Zytoplasma diffundieren kann. Dort aktiviert es die Proteinkinase C, ohne dass ein Zelloberflächenrezeptor stimuliert wird. Ionomycin, ein Calcium Ionophor, wird zusätzlich benötigt um den intrazellulären Calciumgehalt zu erhöhen. Calcium wird für den NFAT Signalweg zur

Genexpression benötigt. PMA in Kombination mit Ionomycin sind deshalb klassische unspezifische Stimulatoren für die Zytokinproduktion.

3.5.4 Stimulation von B Zellen mit Fingolimod

FTY-P (1 μ M; M, Echelon, B-0721, in Methanol) wurde zu B-Zellen zusätzlich zur Stimulation mit CpG plus CD40L oder CpG allein für 3 Tage hinzugegeben. PMA und Ionomycin wurden für die letzten 5 h der Zellkultur zugegeben. Die Überstände wurden abgenommen und mittels ELISA analysiert.

3.5.5 JK6L Zellkultur

Die JK6L Plasmazell-Myelom Zelllinie wurde mit der anfänglichen Zellzahl 600.000 in 50 ml RPMI complete in einer Brutflasche kultiviert.

3.6 ELISAs

Die IL-35 und IL-10 Produktion wurde bestimmt mithilfe des ELISA Kits für „Human Interleukin 35 (IL-35)“ (Cloud-Clone Corp.) und des „Human IL-10 DuoSet“ (R&D systems).

3.6.1 Prinzip des ELISA

Bei ELISAs (*Enzyme linked Immunoabsorbend Assay*) wird ein Antigen immunologisch mithilfe des Sandwich Prinzips nachgewiesen. Dabei bindet das Antigen auf einer Antikörperbeschichteten (engl. *coat antibody* oder *capture antibody*) Mikrotiterplatte. Nach Entfernung des Überstandes wird der Versuchsansatz gewaschen, um nicht oder unspezifisch gebundene Antigene zu entfernen, die eine falsch positive Reaktion auslösen. Im nächsten Schritt wird ein zweiter, gegen das Antigen gerichteter Antikörper (engl. *detection antibody*) hinzugefügt, welcher an ein anderes Epitop bindet als der vorige Antikörper. Es entsteht der Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex, welcher als Sandwich bezeichnet wird. Dieser *detection antibody* kann an ein Enzym gekoppelt sein (Peroxidase oder alkalische Phosphatase) oder biotinyliert sein, wobei Biotin wiederum an Streptavidin, das mit einer Peroxidase gekoppelt ist, binden kann. Ein geeignetes Substrat (Chromogen) wird durch dieses Enzym in ein Reaktionsprodukt umgesetzt und durch Farbumschlag photometrisch gemessen. Dieser Wert ist proportional zur Menge des gebundenen Antigens. Um das Antigen quantitativ nachzuweisen wird eine Standardreihe mit bekannten Antigenkonzentrationen durchgeführt, die eine Kalibrierungskurve ermöglicht, von der die Konzentration des nachzuweisenden Antigens bestimmt werden kann.

3.6.2 IL-10 ELISA

Verwendet wird das „Human IL-10 DuoSet“ von R&D systems. Folgende Materialien müssen vorbereitet werden bevor der ELISA gestartet werden kann: PBS, Wasch-Puffer (0,05% Tween 20 in PBS), *Reagent Diluent* (1% BSA in PBS) und *Stop Solution* 2 N H₂SO₄. Am Vortag wird eine 96 well Mikrotiterplatte (50 µL) mit *Coating Antibody* präpariert. Dazu wird das *Coating Antibody* mit PBS auf eine Arbeitskonzentration von 2,0 µg/mL gebracht und davon 50 µL in jedes Well pipettiert. Die Mikrotiterplatte wird mit einer Folie verschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wird am folgenden Tag abgekippt und die Platte wird dreimalig mit Wasch-Puffer gewaschen, indem die Wells mittels einer Mehrkanal-Pipette (*Multifold dispenser*) gefüllt werden und der Waschpuffer wieder abgekippt wird. Nach einem Blockierungsschritt (Blockierung von unspezifischen Bindungen) mit 150 µL *Reagent Diluent* pro Well für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Tripod Shaker wird der Waschgang 3 Mal wiederholt. Nun ist die Mikrotiterplatte bereit für die Zugabe des Antigens. Dazu wird zunächst eine Standardreihe hergestellt mit 2000 ng/mL rekombinantes IL-10 als höchste Konzentration, verdünnt mit *Reagent Diluent*. Von dieser Ausgangskonzentration wird 7 Mal 1:1 mit *Reagent Diluent* verdünnt. Der 8. Standard ist eine Leerbestimmung mit *Reagent Diluent*. Nun wird diese 8er Standardreihe 2 fach und die jeweiligen Proben zu je 50 µL auf die vorbereitete Mikrotiterplatte pipettiert, mit einer Folie abgedichtet und für 2 h auf einem Schüttler (*Tripod Schüttler*) bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt im Anschluss 3 Mal der obig genannte Waschschrift. Zu jedem Well wird nun 50 µL *Detection Antibody* verdünnt in *Reagent Diluent* mit einer Arbeitskonzentration von 100 ng/ml pipettiert, mit einer Folie abgedichtet und für 2 h auf einem Tripod Shaker bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt im Anschluss drei Mal der obig genannte Waschschrift. 50 µL Streptavidin-horseradish-peroxidase (HRP) wird 1:200 mit *Reagent Diluent* verdünnt und auf die Wells pipettiert, mit einer Folie abgedichtet und für 20 min auf einem Tripod Schüttler bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach einem dreifachen Waschschrift wird nun 50 µL *Subtrate Solution* (1:1 Mischung aus *Color Reagent A* H₂O₂ und *Color Reagent B* Tetramethylbenzidin) hinzupipettiert und 5-10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Ohne das Substrat zu entfernen wird 25 µL *Stop Solution* (2 N H₂SO₄) hinzugefügt. Der ELISA kann nun bei 450 nm im ELISA Reader photometrisch gemessen werden.

3.6.3 IL-35 ELISA

Die Mikrotiterplatten des IL-35 ELISA Kits von Cloud-Clone Corp. sind vorbeschichtet mit *Capture Antibody* gegen EB13 und benutzen einen Biotin-konjugiertes *Detection Antibody* (*Detection Reagent A*), das gegen p35 gerichtet ist. Im *Detection Reagent B* findet sich ein

Peroxidase-markiertes Avidin (HRP) und sorgt für ein Farbumschlag des Tetramethylbenzidins (TMB). Folgende Materialien sind im Kit bereits vorhanden: Standard, *Standard Diluent*, *Detection Reagent A & B*, *Assay Diluent A & B*, TMB Substrat, Stopplösung, Waschpuffer Konzentrat. Der Waschpuffer wird 1:30 fach in destilliertem Wasser verdünnt (20 mL Waschpuffer Konzentrat in 580 mL destilliertes Wasser). Der Standard wird in 1 ml *Standard Diluent* aufgelöst, anschließend gemischt, danach für 10 min bei Raumtemperatur zunächst stehen gelassen und noch mal 1:1 mit *Standard Diluent* verdünnt. Die Konzentration beträgt nun 1000 pg/mL und dient als höchster Standard. Dieser Standard wird 7 fach 1:1 mit *Standard Diluent* verdünnt, der 8. Standard ist eine Leermessung mit *Standard Diluent*. Die Proben und die 8-fache Standardreihe können nun direkt auf die Platten pipettiert werden. Nach Absiegelung mit einer Folie wird die Mikrotiterplatte für 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach Abkippen der Flüssigkeit in jedem Well wird direkt ohne Waschschrift 100 µL *Detection Reagent A* (1:100 verdünnt in *Assay Diluent A*) in die Wells pipettiert, mit einer Folie abgedichtet und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach Abkippen der Flüssigkeit erfolgt ein Waschschrift mit 350 µL Waschlösung mittels einer Mehrkanalpipette. Die Waschlösung soll 2 min einwirken und danach erst entfernt werden. Wiederholt wird dieser Schritt 3 Mal. Nun wird in jedes Well 100 µL *Detection Reagent B* (1:100 verdünnt in *Assay Diluent B*) pipettiert, mit einer Folie abgedichtet und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Der obige Waschschrift erfolgt nun 5 Mal. 90 µL TMB Substratlösung wird hinzugefügt, mit einer Folie abgedichtet und für 20 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. 50 µL Stopplösung wird hinzugefügt und der ELISA bei 450 nm im Reader photometrisch gemessen.

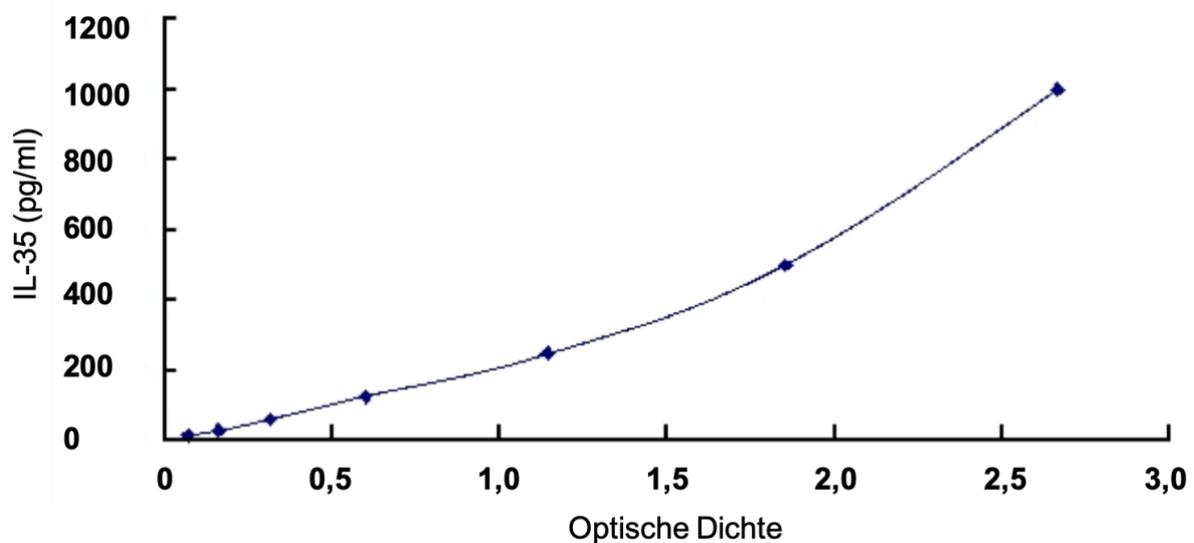


Abb. 4 Repräsentative Standardkurve des IL-35 ELISA Kits.

3.6.4 ELISA Messung

Alle Proben sowie die Standardreihe wurden mindestens 2-fach als technische Replikate gemessen. Als ELISA Reader wurde der Wallac Victor2 Microplate Reader benutzt von Perkin Elmer. Für die Datenaufnahme wurde das geräteigene Software Wallac benutzt. Vor der photometrischen Messung wurde die Unterseite der ELISA Platte gesäubert um etwaige Hintergrundsignale zu minimieren.

3.6.5 ELISA Auswertung

Für die Berechnung der photometrischen Untersuchungswerte der Proben aus dem ELISA Reader benutzen wir die Standardkurve aus der Standardreihe mit schon zuvor bekannten Konzentrationen und tragen die Absorption auf der Y-Achse gegen die Konzentration auf der X-Achse. In Microsoft Excel werden zunächst alle Absorptionswerte der Proben eingetragen (bei 450 nm) und Absorptionswerte einer sogenannten Leermessung der Platte bei 620 nm. Eine Differenz dieser Proben-Werte und der Leermessung-Werte löscht relevante Hintergrundsignale etwa durch Verschmutzung der Unterseite der Platte aus. Die Mittelwerte der technischen Replikate des Standards formen eine Standardkurve, aus der die Signale der Proben berechnet werden (*Point to Point Analyse*).

3.7 Durchflusszytometrie

3.7.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren, das auf der Grundlage von Streulicht- und Fluoreszenzeffekten die Analyse von Eigenschaften der Zellen ermöglicht. Das Prinzip beruht auf der Emission von optischen Signalen nach Passieren eines Laserstrahls durch die Zellen. Jede Zelle tritt nacheinander durch einen Mikrokanal, geformt von einer hochpräzisen Küvette, sodass alle Zellen einzeln durch den Messbereich des Laserstrahls durchgeführt werden. Es kommt einerseits zur Streuung des Laserstrahls, die in Vorwärtsrichtung (engl. *forward scatter*) und Seitwärtsrichtung (engl. *side scatter*) eingeteilt werden können. Der *forward scatter* gibt Aufschluss auf die Zellgröße und der *side scatter* auf die Zellgranularität. Mittels dieser Parameter können die drei Leukozytengruppen (Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten) unterschieden werden. Andererseits können markierte Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffgekoppelte Antikörper durch Laserstrahlen angeregt werden und die emittierte Wellenlänge detektiert werden. Durch selektive Antikörper können daher eine gezielte Zellgruppe oder sogar intrazelluläre sekretorische Proteine auffindig gemacht werden. Der Vorgang, wodurch Antigene durch Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper markiert werden, nennt man Färbung

(*Staining*). Die Durchflusszytometrie wird im englischen Fachgebrauch auch *flow cytometry* bezeichnet. Im Umgangssprachgebrauch wird die Abkürzung „FACS“ (*fluorescence-activated cell sorting*) als Synonym verwendet. Dabei handelt es sich um eine erweiterte Form der Analyse mit zusätzlicher Möglichkeit der Zellsortierung über FACS-Antikörper markierte Zellen. Für jegliche FACS-Messung ist es wichtig stets eine Isotypkontrolle mitzumessen. Isotypkontrollen sind Negativkontrollen, die das Hintergrundsignal des primären Antikörpers messen. Als Isotypkontrollen werden beispielsweise Antikörper benutzt, die keine Bindungsspezifität aufweisen bzw. eine Spezifität aufweisen, die bei der untersuchten Zelle nicht auftritt. Sie entsprechen meist den schweren oder leichten Ketten des primären Antikörpers und des gekoppelten Fluorochroms.

3.7.2 Extrazelluläre FACS Oberflächenfärbung

Für die extrazelluläre Färbung können Zellen aus der Kultur direkt auf eine 96 well *V-Bottom* Platte pipettiert werden. Alle folgenden Schritte müssen gekühlt auf Eis durchgeführt werden. Nach Zentrifugation der Platte bei 1600 rpm, 4 °C und 5 min, wird der Überstand abgekippt, die Pellets in 150 µL FACS Puffer (PBS mit 1% BSA) gewaschen und wiederum bei 1600 rpm, 4 °C und 5 min zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstands werden die Pellets in 50 µL Färbelösung resuspendiert. Diese Färbelösung enthält die Oberflächen-FACS-Antikörper verdünnt mit FACS Puffer auf die Arbeitskonzentration des Antikörpers, die unter 2.7 zu entnehmen sind. Die Mikrotiterplatte wird im Dunkeln auf Eis für 20 min inkubiert. Es erfolgt der obig genannte Waschschrift (150 µL FACS Puffer pro well, Zentrifugation bei 1600 rpm, 4 °C und 5 min, Abkippen) zwei Mal hintereinander. Die Pellets werden in 130 µL FACS Puffer resuspendiert und in FACS Röhrchen übergeführt. Die Zellen sind nun bereit für die Analyse am FACS Gerät.

3.7.3 Intrazelluläre FACS Färbung

3.7.3.1 Prinzip der intrazellulären FACS Färbung

Die intrazelluläre FACS Färbung ermöglicht die Detektion sekretorischer Proteine in Zellen. Kombiniert man diese Methode mit einer extrazellulären Oberflächenfärbung können somit einzelne Subpopulationen auf bestimmte sekretorische Proteine näher betrachtet werden. Die Detektion intrazellulärer Antigene setzt eine Fixierung und anschließende Permeabilisierung der Zelle voraus um den Transport Fluoreszenz-markierter Antikörper in die Zelle zu ermöglichen. Zur Erhöhung des Signals der intrazellulären Antikörper während der Analyse im Durchflusszytometer werden die Zellen zuvor 4 h mit Monensin, PMA und Ionomycin vorbehandelt. Monensin ist ein Proteintransportinhibitor, der im Golgi-Apparat den

transmembranen Na/H Transport blockiert. Es resultiert eine Akkumulation der sekretorischen Proteine im Golgi-Apparat und im endoplasmatischen Retikulum. Damit wird die Zytokinproduktion durch PMA und Ionomycin zusätzlich verstärkt und mehr Antigen für die Fluoreszenz-markierten Antikörper dargeboten.

3.7.3.2 Protokoll der intrazellulären FACS Färbung

Folgendes Protokoll wird im Folgenden benutzt für die extrazelluläre und intrazelluläre Färbung: Nach zusätzlicher Stimulation der letzten 4 h mit Monensin (BD Golgistop 1:1500 Verdünnung), PMA 50 ng/mL, Ionomycin 1 µg/mL werden Zellen aus der Kultur auf eine 96 well *V-Bottom* pipettiert. Die nachfolgenden Schritte sind identisch mit der extrazellulären Oberflächenfärbung und sind unter 3.7.2 zu entnehmen. Nach zweifachen Waschschrift nach Inkubation mit den Oberflächen FACS Antikörper werden die Pellets in 100 µL *Fixation/Permeabilisation*-Puffer (Konzentrat 1:3 in Diluent verdünnt) resuspendiert und für 30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Darauffolgend werden 2 Waschschrte mit *Permeabilization* Puffer (1:10 verdünnt in destilliertem Wasser) durchgeführt. Nach Abkippen des Überstands wird das Pellet in 50 µL intrazellulärer Farbe-Lösung resuspendiert. Diese Farbe-Lösung enthält die intrazelluläre FACS Antikörper verdünnt mit *Permeabilization* Puffer auf die Arbeitskonzentration des Antikörpers, die unter 2.6 zu entnehmen sind. Die Mikrotiterplatte wird im Dunkeln auf Eis für 45 min inkubiert. Es erfolgt der Waschschrift mit *Permeabilization* Puffer zwei Mal hintereinander. Die Pellets werden in 130 µL FACS Puffer resuspendiert und in FACS Röhrchen übergeführt. Die Zellen sind nun bereit für die Analyse am FACS Gerät.

3.7.4 Durchflusszytometrische Messung

Die Messungen wurden am 10 Kanal Durchflusszytometer FACSVerser von Becton Dickinson durchgeführt. Für die Datenaufnahme wurde das geräteigene BD FACSuite benutzt. Um die Variabilität zu minimieren und die spektrale Kompensation der Messungen zu optimieren, wurden vor jeder Messung am Durchflusszytometer Gerät eine Kalibrierung mittels BD Kompensationsbeads durchgeführt. Für die Messung der IL-35 Produktion der B Zellen wurde als Positivkontrolle der intrazellulären Färbung eine parallele Messung von IL-10 durchgeführt, um die Kontrolle zu gewährleisten, ob sowohl Stimulation als auch intrazelluläre Färbung erfolgreich waren.

3.7.5 Durchflusszytometrische Auswertung

Die Analyse der durchflusszytometrischen Daten wurde mit der Software FlowJo durchgeführt. Um einzelne Zellpopulationen und wiederum deren Subpopulationen zu charakterisieren

wurden mehrere *Gating* („Schleuse“) Strategien durchgesetzt. *Gating* bezeichnet eine Methode um nicht interessierende Zellen von weiterer Analyse auszuschließen und deshalb den Fokus auf B Zellpopulationen zu setzen. B-Zellen werden mit dem B-Zell-typischen Oberflächenmarker CD19 „gated“. B-Zellen können wiederum beliebig auf die Subpopulationen mit CD24, CD27, CD38, CD138 gated werden (s. Abb. 5). Wenn parallel eine intrazelluläre Färbung auf Zytokine wie IL-10 oder IL-35 durchgeführt wurde, kann gleichzeitig die Zytokinproduktion der gateden Zelle überprüft werden. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass IL-10 oder IL-35 gatede Zellen auf deren Oberflächenmarker untersucht werden können.

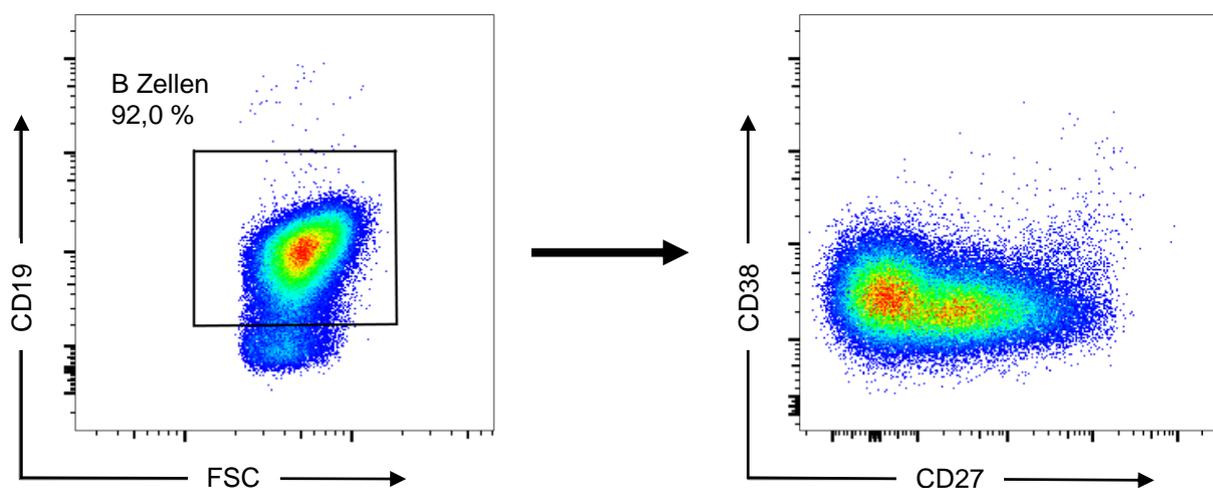


Abb. 5 CD19 B-Zell *Gating*. Humane B Zellen wurden 3 Tage lang mit CpG+CD40L+FTY stimuliert. In den letzten 4 h wurde PMA+Ionomycin+Monensin hinzugefügt. CD19+ B-Zellen machen 92,0% der Gesamtzellzahl aus. Nach *Gating* auf CD19 kann die gleichzeitige Expression von CD38 und CD27 betrachtet werden.

3.7.5.1 Prinzip der IL-35 Färbung

Da FACS-Antikörper für IL-35 aktuell nicht vorhanden sind, wurden Antikörper für die beiden Untereinheiten EBI3 und p35 verwendet. Eine Doppelmarkierung einer Zelle mit beiden Untereinheiten ist der Hinweis für die Produktion von IL-35. Das Prinzip dieser Färbemethode wurde in Vorversuchen etabliert. Dabei wurden drei Tage lang B Zellen mit CpG und CD40L stimuliert und als Kontrolle nicht stimulierte frische B Zellen auf CD19, EBI3 und p35 mit deren Isotypkontrollen gefärbt. EBI3 und p35 wurden jeweils in Kombination und einzeln gefärbt (s. Abb. 5). Eine Doppelmarkierung der B-Zellen mit EBI3 und p35 (rot in der Abb. 5) ergibt eine IL-35 produzierende B-Zell-Population. In den Einzelfärbungen von p35 (blau in der Abb. 5) und EBI3 (orange in der Abb. 5) ist erkennbar, dass sich die Doppelmarkierung genau aus diesen Einzelfärbungen zusammensetzt. Die nichtstimulierte B Zellen weisen eine

mittlere EBI3-Produktion auf (dunkelgrün in der Abb. 6), jedoch keine p35 Produktion und damit keine IL-35 Produktion. Die Isotypkontrolle (hellgrün in der Abb. 5) dient als Negativkontrolle aller Messungen.

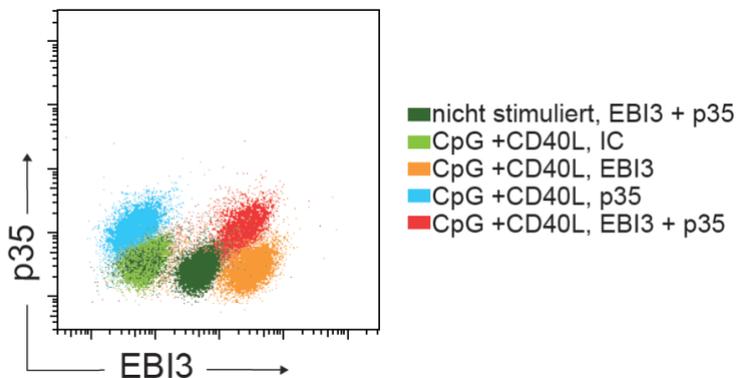


Abb. 6 Prinzip der IL-35 Färbung. Humane B-Zellen wurden 3 Tage lang mit CpG+CD40L stimuliert und parallel ohne Stimulus kultiviert. In den letzten 4 h wurde PMA+Ionomycin+Monensin hinzugefügt. Nach Gating auf CD19+ B-Zellen wurden EBI3 und p35 Expression auf den stimulierten und nicht stimulierten B Zellen betrachtet. Die Kombination von EBI3 + p35 = IL-35 (rot) besteht aus p35 (blau) und EBI3 (orange). Die Isokontrolle (hellgrün) stellt die Negativkontrolle dar. Bei nicht stimulierten B-Zellen (dunkelgrün) ist eine intermediäre EBI3 Expression, aber keine p35 Expression vorhanden.

3.8 *Quantitative PCR (qPCR)*

3.8.1 Prinzip der quantitativen PCR

Die quantitative PCR stellt eine Methode zur Quantifizierung der mRNA dar. Dabei werden Nukleinsäuren amplifiziert, wobei der Verlauf der Vervielfältigung der gewonnenen DNS während der Reaktion verfolgt und quantifiziert werden kann. Sie wird auch Real-time PCR genannt und basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR. Über Fluoreszenzmessungen in jedem PCR-Amplifikationszyklus kann in der exponentiellen Phase der Amplifikation eine Quantifizierung der DNS Produkte vorgenommen werden. Für die Detektion von DNS Produkten gibt es verschiedene fluoreszenzmarkierte Moleküle. Die folgenden Experimente verwenden Taqman Sonden. Diese beinhalten spezifische Gensonden, die kurze DNS-Abschnitte komplementär zu der gesuchten Gensequenz beinhalten und mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (z.B. FAM) und einem Quencher markiert sind. Durch den Fluoreszenz-Resonanzenergie Transfer (FRET) wird die Donor Fluoreszenz (Reporter) durch einen in ausreichender Nähe befindliches Akzeptor-Fluorochrom absorbiert. Wenn beim Elongationsschritt die DNS Polymerase mithilfe der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität die Sonden am 5'-Ende abbaut, wird der Reporter freigesetzt und damit die Fluoreszenz messbar. Je stärker das

Fluoreszenzsignal, desto mehr DNS des Gens war vorhanden und mehr DNS-Reaktionsprodukte wurden amplifiziert.

3.8.2 Isolieren von RNS aus Zellen

Zum Zellaufschluss werden Zellen mit Mercaptoethanol 1:100 verdünnt in RLT Lysepuffer vermischt. Die anschließende Lysatlösung kann bei -80 °C eingefroren oder sofort verwendet werden. Die nachfolgenden Schritte richten sich nach dem Protokoll von QIAGEN RNeasy Mini Kit Teil 1 und Teil 2. 350 µL des Lysats werden mit 350 µL 70% Ethanol vermischt. 700 µL dieser Probe wird auf eine RNeasy-Mini-Spin-Säule, die auf einem 2 mL Sammelgefäß aufgesteckt ist, übertragen. Die Säule mit Sammelgefäß wird bei 8000 G und 15 s zentrifugiert. Die durchgeflossene Flüssigkeit im Sammelgefäß wird verworfen. Zur DNase Verdauung wird 350 µL Buffer RW1 auf die Säule hinzupipettiert und wiederum bei 8000 G und 15 s zentrifugiert. 10 µL der DNase I Lösung wird vorsichtig zu 70 µL Buffer RDD pipettiert und durch Schwenken des Eppendorf-Gefäßes durchmischt. Diese Lösung wird auf die Säule pipettiert und bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. 350 µL des RW1 Puffers wird auf die Säule hinzupipettiert und bei 8000 G und 15 s zentrifugiert. 500 µL des RPE Puffers wird auf die Säule hinzupipettiert und bei 8000 G und 15 s zentrifugiert. Dieser Schritt wird wiederholt und für 2 min zentrifugiert. Um die Säulenmembran von restlicher Flüssigkeit zu befreien, wird die Säule in einem frischen Sammelgefäß für eine weitere Minute zentrifugiert. Im nächsten Schritt wird die RNS ausgewaschen. Dazu wird die Säule auf ein 1,5 mL Eppendorf Gefäß gesetzt, 50 µL RNase freies Wasser auf die Säule pipettiert und bei 8000 G und 1 min zentrifugiert. Dieser Schritt der Elution der Säule wird zum Erreichen einer höheren Ausbeute wiederholt. Der RNS Gehalt der eluierten Fraktion wird im NanoDrop Mikrovolumen-Spektralphotometer bestimmt. Die RNS kann zur Aufbewahrung bei -80 °C eingefroren werden.

3.8.3 Reverse Transkription

Das Umschreiben der RNS in cDNS wird mit dem „High-capacity Reverse Transcription“ Kit durchgeführt. Das herstellereigene Protokoll ist für eine 20 µL (10 µL RT Master Mix + 10 µL RNS Probe) Reaktionsmenge ausgerichtet. Wir verwenden einen 50 µL Ansatz (25 µL RT Master Mix + 25 µL RNS Probe) und multiplizieren die Komponenten des RT Master Mix mit 2,5. Dementsprechend werden folgende Mengen für den RT Master Mix benutzt: 5 µL 10x RT Puffer, 2 µL 25x dNTP Mix, 5 µL 10x Primer, 2,5 µL RT, 10,5 µL Wasser. 25 µL des RT Master Mix werden mit 25 µL RNS Probe durch Auf- und Abpipettieren in einem 0,2 mL PCR tube durchmischt. Ein kurzes Zentrifugieren verhindert Luftbläscheneinschlüsse und sorgt

dafür, dass der komplette Inhalt am Boden des Tubes bleibt. Die Proben werden in den Thermal Cycler mit folgendem Programm für RT gestellt: 10 min 25 °C, 120 min 37 °C, 5 min 85 °C, unendlich lange 4 °C. Nach der RT wird die cDNS Konzentration im Nanodrop gemessen. Die cDNS Konzentration wird von allen Proben auf 1 ng/mL verdünnt. Verdünnungsmedium ist Wasser. Die cDNS kann zur späteren Verwendung bei -20 °C eingefroren werden.

3.8.4 qPCR Durchführung

Die Durchführung der qPCR basiert auf das Eurogentec qPCR Core Kit, das in Verbindung mit Uracil-N-glycosylase (UNG), AmpliTaq Gold Polymerase, den entsprechenden Primer und der cDNS verwendet wird. Der Ansatz beläuft sich auf 20 µL. Der Master Mix (aus Eurogentec qPCR Core Kit) besteht aus 2 µL 10x Reaction Buffer, 2 µL 50 mM MgCl₂, 0,8 µL 5 mM dNTP Mix, 2,9 µL RNase freies Wasser. Zum Master Mix addieren sich 0,2 µL UNG (Zielkonzentration: 0,01 U/µL), 0,1 µL AmpliTaq Gold Polymerase (Zielkonzentration: 0,025 U/µL), 4 µL der Primer, 5 µL cDNS und 3 µL RNase freies Wasser. Die fertigen Proben werden in eine 96 Well qPCR Platte übertragen und mit einer Folie verschlossen. Bei 1200 rpm wird die Platte für 2 Minuten zentrifugiert, damit sich die Flüssigkeit gleichmäßig am Boden der Platte sammelt. Anschließend wird die Platte im Real Time Thermocycler analysiert. Das Programm wurde folgendermaßen eingerichtet: Anfangsschritt (UNG-Aktivierung) 2 min 50 °C, AmpliTaq Gold Polymerase Aktivierung (UNG Deaktivierung) 10 min 95 °C, 40 Zyklen Denaturierung 95 °C und Annealing/Extension 1 min 60 °. Für die Messungen wird als Referenz stets das Haushaltsgen (*engl. Housekeeping Gen*) humanes Peptidylprolylisomerase A (PPIA oder auch Cyclophilin A) zur Datennormierung benutzt.

3.8.5 qPCR Auswertung

Die Auswertung der qPCR richtet sich an den sogenannten Ct-Wert (cycle threshold=Schwellenwert-Zyklus). In einem Amplifikationsplot mit der Anzahl der Zyklen auf der x-Achse gegen die Fluoreszenzintensität auf der y-Achse bezeichnet der Ct-Wert den Zyklus, bei dem zum ersten Mal genug amplifiziertes Produkt vorhanden ist, um ein Fluoreszenzsignal zu erhalten, das signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Dieser Wert befindet sich in der exponentiellen Phase der DNS Replikation. Die Mengen an cDNS können damit mit dem Ct-Wert des Housekeeping Gens verglichen werden. Dabei ist darauf zu achten, dass bei großer Menge an anfänglichen cDNS der Ct-Wert schnell eintritt und deshalb klein ist. Ein größerer Ct-Wert besagt das Gegenteilige. Eine relative Quantifizierung geschieht durch die Normalisierung der Daten mit dem Housekeeping Gen. Die Expression des Housekeeping Gens ist idealerweise unabhängig von Regulationen der Zellfunktion. Die

Expression der zu untersuchenden Proben wird mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode als prozentualer Anteil der Expression von PPIA dargestellt.

3.9 Patienten und Probanden

Alle Patienten- und Probandenproben wurden nach schriftlicher Zustimmung nach den örtlichen Ethikrichtlinien in Stockholm sowie in München und der Deklaration von Helsinki erhoben.

Folgende Proben standen zur Analyse zur Verfügung: Plasma von unbehandelten MS-Patienten (CIS: n = 18, RR-MS: n = 21, SP-MS: n = 13) und unbehandelte Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen (ANEs: n = 25) oder anderen entzündlichen neurologischen Erkrankungen (AENEs) (n = 13). Die Gruppe der Patienten mit ANEs enthielt folgende Erkrankungen: n = 10: sensorische Symptome, n = 1: alkoholbedingte spastische Paraparese, n = 1: Schwindel, n = 1: Syringomyelie, n = 1: idiopathische intrakranielle Hypertonie, n = 1: Morbus Bechterew, n = 1: Hörminderung, n = 1: Depression/ idiopathischer Schmerz, n = 1: Diplopie, n = 1: Fatigue, n = 1: zerebrovaskuläre Erkrankung, n = 1: Migräne, n = 1: spinale Stenose (Läsionen der weißen Substanz), n = 1: Neurasthenie, n = 1: bipolare Störung, n = 1: Schizophrenie. In der Gruppe der Patienten mit AENEs sind eingeschlossen: n = 4: systemischer Lupus erythematoses, n = 1: Borreliose, n = 1: Sjögren-Syndrom, n = 1: Neurosarkoidose, n = 2: Myasthenia gravis, n = 2: Granulomatose mit Polyangiitis, n = 1: Enzephalitis / Epilepsie, n = 1: Creutzfeld-Jakob-Krankheit. Eine detailliertere Beschreibung der Patienten ist in Tabelle 4 angegeben.

	<i>CIS</i>	<i>RR-MS</i>	<i>SP-MS</i>	<i>ANE</i>	<i>AENE</i>
<i>Proben</i>	18	21	13	25	13
<i>Geschlecht w/m</i>	14/4	15/6	9/4	15/10	11/2
<i>Mittleres Alter +/- SD (Bereich)</i>	37 +/- 11 (21-63)	40 +/- 12 (21-62)	52 +/- 9 (35-62)	40 +/- 12 (19-68)	42 +/- 14 (25-78)

RR-MS=relapsing-remitting Multiple Sklerose; CIS=Klinisch Isoliertes Syndrom; SP-MS=sekundär progressive MS; ANE=andere neurologische Erkrankungen; AENE=andere neuroinflammatorische Erkrankungen; w=weiblich; m=männlich; SD=Standardabweichung.

Tabelle 4. Charakterisierung der Patientenproben

Zur Analyse der Effekte der Fingolimod-Behandlung wurden die IL-35-Spiegel in Plasmaproben von 34 MS-Patienten vor und nach der Behandlung gemessen. Die Zeit nach der Behandlung variierte zwischen 6 und 30 Monaten. Darüber hinaus folgte eine Analyse des Plasmas von 12 Patienten vor und 3 Monate nach der Behandlung mit Rituximab, sowie 14 Patienten unter Rituximab Behandlung, bei denen keine Proben vor Beginn der Behandlung existieren. Eine detaillierte Beschreibung der Behandlungsdauern ist in Tabelle 5 zu finden.

	Baseline	Post-Behandlung:					
		3M	6M	9M	12M	24M	30M
Fingolimod, MS (n)	34		21	1	10	1	1
Rituximab, MS (n)	12	12					

MS, Multiple Sklerose; M, Monate.

Tabelle 5. Behandlungsdauer der Patienten mit Multipler Sklerose: Fingolimod, Rituximab.

3.10 Statistische Analysen

Die statistische Signifikanz wurde mit Prism Software (GraphPad) durch ungepaarte oder gepaarte, nicht parametrische oder parametrische t-Testanalyse oder durch Spearman's Korrelation beurteilt. P-Werte von * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$ wurden als signifikant gewertet und entsprechend bezeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 *IL-35 und IL-10 Produktion von humanen B Zellen durch Stimulation mit TLR –Liganden und CD40L*

4.1.1 **Regulatorische B-Zellen werden nach Stimulierung von zwei Tagen rekrutiert**

Die Identifikation der regulatorischen B-Zellen bedarf zunächst die Suche nach der passenden Stimulationszeit. Dabei soll sekretorisches IL-10 in Abhängigkeit von der Zeit bzw. von der Entwicklung der B-Zellen gemessen werden. Je höher die Produktionsmenge der Zytokine, desto differenzierter kann die phänotypische Analyse der Bregs stattfinden. Dazu wird ein Versuch durchgeführt, bei dem die Fähigkeit der IL-10 Produktion der B-Zellen im 2-Tages-Abstand bestimmt wird (siehe Abb. 7). Wird ab einer gewissen Stimulationszeit keine IL-10 Produktion mehr gemessen, ist eine längere Stimulation über dem Zeitpunkt hinaus nicht mehr sinnvoll. Als Stimuli werden zwei etablierte B-Zell-Stimulationsprotokolle benutzt, dazu gehören: *CpG* und *R848+IL2*. Die Messung von IL-10 im ELISA und qPCR wurde am Tag 0, Tag 2, Tag 4, Tag 6 und Tag 8 getätigt. Mit *CpG* werden bereits isolierte B-Zellen stimuliert, wohingegen *R848+IL2* als ein etabliertes Stimulationsverfahren für PBMCs benutzt wird. Um die regulatorische Eigenschaft der B-Zellen aus dem *R848+IL2*-Protokoll zu bestimmen, werden am jeweiligen Analysetag B-Zellen aus PBMCs isoliert. Für die ELISA-Messung von B-Zellen beider Protokolle werden Überstände verwendet, die nach Waschen der B-Zellen mittels PBS nochmals im frischen Medium (d.h. ohne Stimulatoren) 24 h im Inkubator kultiviert wurden. Der daraus gewonnene Überstand zeichnet somit den Zeitpunkt der bis dahin differenzierten B Zellen aus, die innerhalb von 24 h IL-10 produzieren können. Es wird zusammengefasst also keine kumulative Menge ab Tag 0 gemessen. Für die qPCR Analyse werden die B-Zellen des jeweiligen Tages sofort eingefroren und gesondert analysiert.

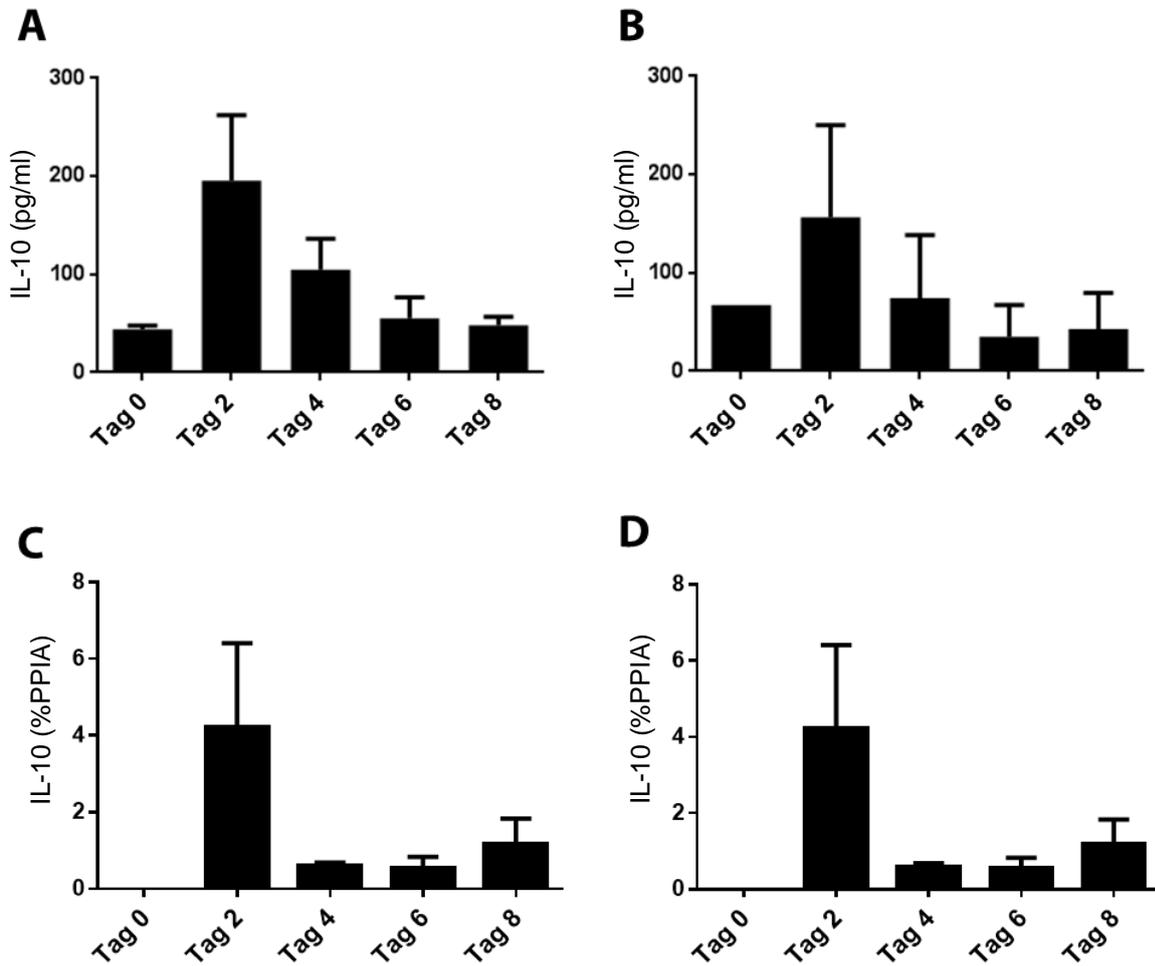


Abb. 7 Zeitstrahl der IL-10-Produktion. IL-10 zeigt in den früheren Stadien der Stimulation eine höhere Produktion und Expression. **A+C:** B Zellen wurden mit CpG stimuliert und am jeweiligen Tag gewaschen und 24h unstimuliert kultiviert. Dieser Überstand wurde im IL-10 ELISA gemessen (**A**). Am jeweiligen Tag wurden ebenfalls B-Zellen eingefroren zur späteren IL-10 qPCR Analyse (**C**). **B+D:** PBMCs wurden mit R848+IL2 stimuliert und am jeweiligen Tag daraus B-Zellen isoliert und 24h unstimuliert kultiviert. Der Überstand wurde im IL-10 ELISA gemessen (**B**). Am jeweiligen Tag wurden ebenfalls B-Zellen eingefroren zur späteren IL-10 qPCR Analyse (**D**). (kombinierte Daten von 3 unabhängigen Experimenten, Mittelwert \pm SD)

Die Stimulationen mit *CpG* und *R848+IL2* zeigen, dass B Zellen vor allem in früheren Stadien eine gesteigerte IL-10 Produktion erfahren (s. Abb. 7). Der Höhepunkt im Rahmen dieses Messschemas ist am zweiten Tag zu verzeichnen und fällt stetig Richtung Tag 8 ab. Da ab Tag 4 keine Erhöhung der IL-10 Produktion zu messen ist und ebenso mit der Stimulationsdauer die Überlebensfähigkeit der B-Zellen in Kultur abnimmt, wurde eine optimale Gesamtstimulationsdauer von 2-4 Tagen festgestellt.

4.1.2 IL-35 und IL-10 Produktion von humanen B Zellen wird induziert mittels Koaktivierung von TLR7/8, 9 und CD40L

In diesem Experiment werden menschliche B-Zellen auf die Fähigkeit zur Produktion von IL-35 überprüft. Ebenso wird beantwortet, welche Stimulatoren am stärksten die IL-35-Produktion fördern und wie diese in Vergleich zur IL-10 Sekretion stehen. Dazu wurden menschliche B-Zellen isoliert und einer Stimulation mittels verschiedenen TLR-Agonisten mit oder ohne CD40L Kostimulation unterzogen. Die Stimulationsdauer wird für 3 Tage angesetzt, wobei zusätzlich die unspezifischen Stimulationsreagenzien PMA und Ionomycin zur besseren Zytokindetektierung während der letzten 5 h der Stimulation zugesetzt werden. Die Überstände der gesamten B-Zell-Kultur werden anschließend für die IL-35 und IL-10 ELISA Analyse gesammelt (s. Abb. 8). In diesem Experiment kann bestätigt werden, dass menschliche B-Zellen in der Lage sind IL-35 zu produzieren. Zu beobachten ist vor allem, dass der TLR-7/8-Ligand R848 (Resiquimod) in Kombination mit CD40L und der TLR-9-Ligand CpG allein und in Kombination mit CD40L am stärksten die IL-35-Produktion induzieren können. Ein Vergleich mit IL-10 ergibt eine Ähnlichkeit der stärksten IL-35 und IL-10 Induktoren. Allerdings induzierte die Stimulation mit CD40L allein bereits eine deutliche IL-10 Produktion.

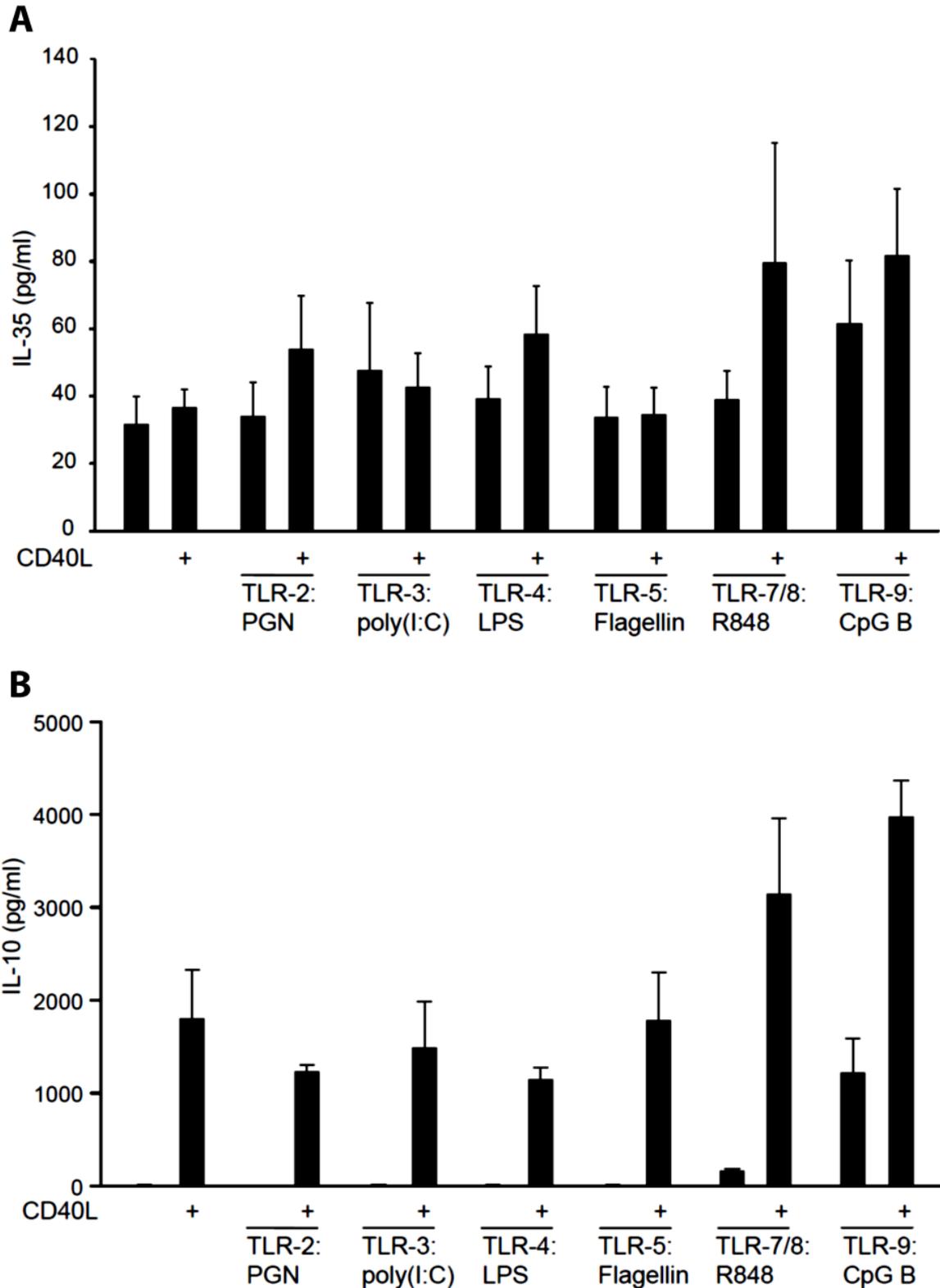


Abb. 8 Humane B-Zellen produzieren IL-35 nach Stimulation. TLR7/8,9 und CD40 stellen die kompetentesten Stimulatoren dar. **A+B**: B-Zellen wurden durch TLR-Liganden mit oder ohne CD40L aktiviert für 3 Tage mit PMA+Ionomycin in den letzten 5h. Die Überstände wurden geerntet und die IL-35 (**A**) - und IL-10 (**B**) -Produktion wurde durch ELISA bestimmt (kombinierte Daten von 3 unabhängigen Experimenten, Mittelwert \pm SD).

4.2 IL-35-Produktion durch menschliche B-Zellen kann durch FACS-Analyse in heterogenen B-Zellpopulationen mit Dominanz in Plasmablasten und Plasmazellen bestimmt werden

4.2.1 Zielstellung

Der genaue Phänotyp der IL-35 produzierenden regulatorischen B-Zellen (sog. B35 Zellen) bleibt umstritten. Eine Charakterisierung der B35 Zellen wird in diesem Abschnitt als Ziel gesetzt. Bereits bekannte Oberflächenmarker der regulatorischen IL-10 produzierenden Zellen (sog. B10 Zellen) werden als Angriffspunkt der Untersuchung verwendet. Die Vorgehensweise wird im Folgenden in zwei Schritten geteilt:

1. In einem Suchexperiment mittels FACS Analyse werden zur gleichen Zeit Oberflächenmarker von IL35-positiven B-Zellen bestimmt. Eine signifikante Erhöhung des Signals eines Oberflächenmarkers soll im nächsten Schritt untersucht und bestätigt werden.
2. Im Bestätigungstest mittels ELISA wird der gefundene Marker auf seine IL-35 Produktion geprüft, indem nach Stimulation von B-Zellen die Oberflächenmarker-positive Population mittels Zellseparation isoliert wird. Die daraus resultierende positive und negative Oberflächenmarker-Population werden ohne Stimulatoren nochmals in Kultur gehalten und auf ihre IL-35 Produktion untersucht und verglichen. Bei signifikanter Erhöhung der IL-35 Produktion wird der Oberflächenmarker zum Phänotyp der B35 Zellen gezählt. IL-10 wird bei den Experimenten als Kontrolle stets mitgemessen.

4.2.2 Etablierung der intrazellulären IL-35 und IL-10 Färbung

Für die intrazelluläre FACS-Färbung wurde die Verwendung von Antikörpern gegen die IL-35-Subuntereinheiten EBI3 und p35 zur Visualisierung von B35-Zellen etabliert. Zur Beurteilung der Spezifität dieser Färbung wurde sowohl einzelne als auch doppelte Färbungen (EBI3+p35) gegen die IL-35-Untereinheiten und unstimulierte bzw. stimulierte B-Zellen verwendet (siehe Methodenteil). Dabei konnte eine IL-35+ B-Zellpopulation im Vergleich zu unstimulierten B-Zellen ausgemacht werden (s. Abb. 6 und 9). IL-35+ B-Zellen können somit in folgenden Experimenten mithilfe Gating Strategien bezüglich der Oberflächenmarker-Expression analysiert werden. Parallel wurde der intrazelluläre IL-10-Antikörper ebenso nach gleichem Schema im Vorversuch getestet (s. Abb. 9).

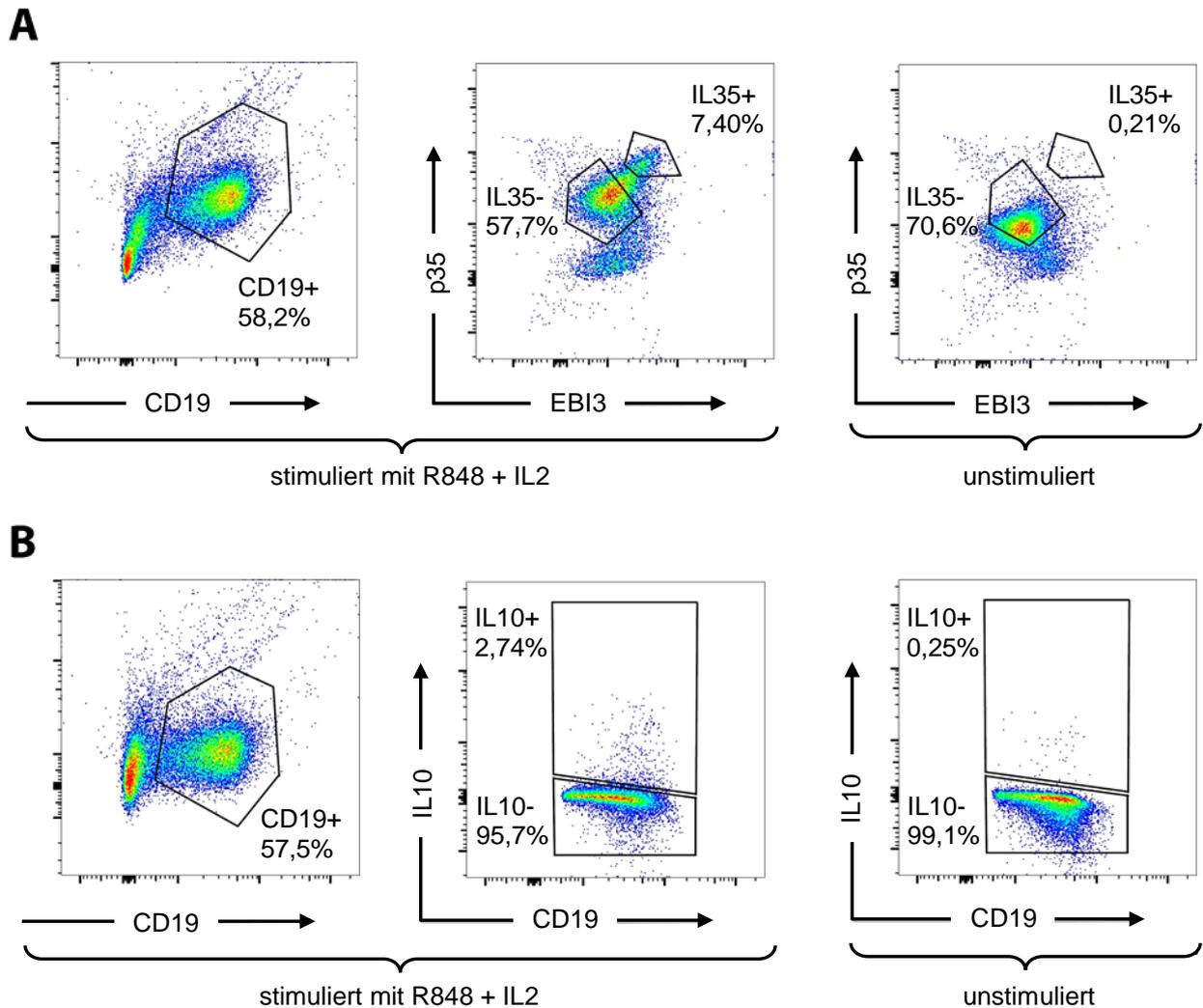


Abb. 9 IL-35 und IL-10 *Gating* Strategie. PBMCs wurden 2 d mit R848+IL2 stimuliert und in den letzten 4h PMA + Ionomycin + Monensin hinzugefügt. **A+B:** Nach CD19 B-Zell Gating kann eine IL-35+/IL-35- (**A**) bzw. IL-10+/IL-10- (**B**) B Zell Population bei den stimulierten B-Zellen im Vergleich zu den unstimulierten B-Zellen ausgemacht werden. Das IL-35+/IL-35- bzw. IL-10+/IL-10- Gate kann nun phänotypisch analysiert werden.

4.2.3 Phänotypisierung IL-35-produzierender B Zellen (B35 Zellen)

4.2.3.1 Durchflusszytometrische Analyse

Zur Charakterisierung von Oberflächenmarkern von IL-35-produzierenden B-Zellen wird die intrazelluläre Färbung für IL-35 mit einer Oberflächenfärbung für CD24, CD27, CD38 und CD138 kombiniert. Diese sind Marker, die zuvor auf regulatorische B10 Zellen beschrieben worden sind [39, 40, 47, 48]. Zur selektiven Expression dieser Oberflächenmarker, werden verschiedene B-Zell-Stimulationsprotokolle verwendet. Das Stimulationsprotokoll von B Zellen mit *CpG+CD40L* und *R848+CD40L* für 3 Tage und *PMA + Ionomycin + Monensin* in den letzten 4h bringt CD24+, CD38+ und CD27+ B Zellen hervor. Bei Stimulation von PBMCs mit *R848+IL2* für 2 Tage und *PMA + Ionomycin + Monensin* in den letzten 4h fördert die

Entwicklung insbesondere CD38 und CD138 positiver B Zellen, die Plasmablasten und Plasmazellen charakterisieren [47, 48]. In der FACS Analyse wurde ein Gate gemäß im Vorkapitel auf IL-35+ und IL-35- B-Zellen gesetzt und anschließend die Oberflächenexpression betrachtet. Die (arithmetrisch) mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) der Färbungen wurde jeweilig bestimmt (s. Abb. 10).

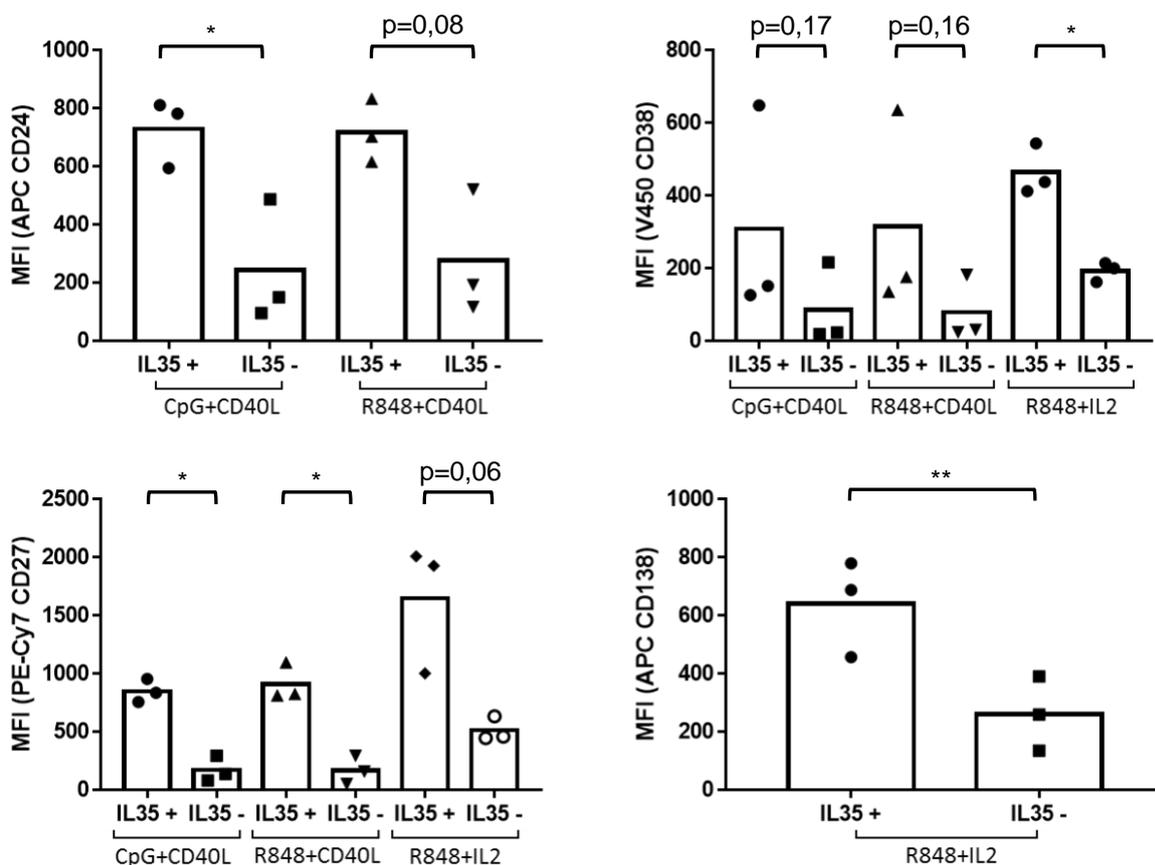


Abb. 10 IL-35 Oberflächenmarkerexpression. B Zellen bzw. PBMCs wurden nach verschiedenen Protokollen stimuliert: B Zellen mit CpG+CD40L für 3d, B Zellen mit R848+CD40L für 3d, PBMCs mit R848+IL2 für 2d. In den letzten 4h wurde PMA + Ionomycin + Monensin für die intrazelluläre FACS Analyse hinzugefügt. Nach Gating auf CD19+ B Zellen wurden ein Gate auf IL-35+ und IL-35- B Zellen gerichtet. Von 3 unabhängigen Versuchen wurde die MFI von CD24, CD38, CD27 und CD138 ermittelt. Je nach Stimulationsprotokoll sind alle Oberflächenmarker für IL-35+ B-Zellen signifikant erhöht. (kombinierte Daten von 3 unabhängigen Experimenten, Mittelwert \pm SD, paired t-test).

Je nach Art der Stimulation kann eine signifikante Erhöhung von verschiedenen Oberflächenmarkern von IL-35+ B-Zellen begünstigen und somit den Phänotyp von B35-Zellen ändern. Die CpG+CD40L bzw. R848+CD40L Stimulation bewirkt bei IL-35+ B Zellpopulationen eine Erhöhung der Expression von CD24 und CD27 gegenüber IL-35- B Zellen. Die R848+IL2 Stimulation erhöht signifikant die Expression von CD138 und CD38.

Ein Vergleich mit der IL-10 Produktion wurde ebenso durchgeführt (s. Abb. 11). Nach Gating der IL-10+/IL-10- B-Zellen wurde eine signifikant erhöhte Expression von CD24 bei Stimulation mit CpG+CD40L bzw. R848+CD40L beobachtet. Bei Stimulation mit R848+IL2 zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Expression von CD138. Obwohl CD27 keinen signifikanten Unterschied in den drei unabhängigen Experimenten zeigt, ist dennoch eine Erhöhung der CD27 Expression in allen Untersuchungspaarungen zu verzeichnen. CD38 ist bei allen Stimulationen kein eindeutiger Marker von B10 Zellen.

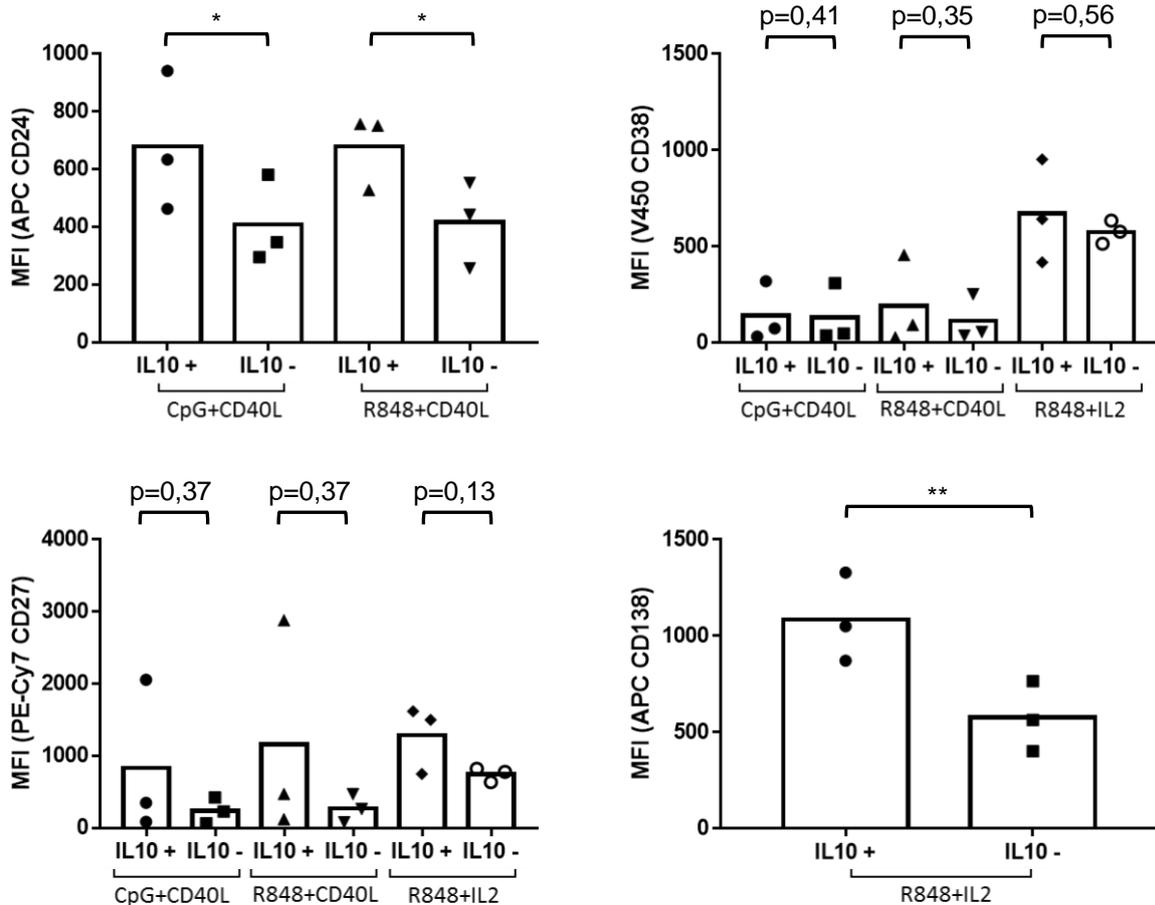


Abb. 11 IL-10 Oberflächenmarkerexpression. B Zellen bzw. PBMCs wurden nach verschiedenen Protokollen stimuliert: B Zellen mit CpG+CD40L für 3d, B Zellen mit R848+CD40L für 3d, PBMCs mit R848+IL2 für 2d. In den letzten 4h wurde PMA + Ionomycin + Monensin für die intrazelluläre FACS Analyse hinzugefügt. Nach Gating auf CD19+ B Zellen wurden ein Gate auf IL-10+ und IL-10- B Zellen gerichtet. Von 3 unabhängigen Versuchen wurde die MFI von CD24, CD38, CD27 und CD138 ermittelt. (kombinierte Daten von 3 unabhängigen Experimenten, Mittelwert \pm SD, paired t-test).

Die Ergebnisse dieser Experimente veranlassten im Anschluss eine Untersuchung der Bedeutung dieser Oberflächenmarker bei B35 und B10 Zellen. Bekannte Zellpopulationen wie transitionale B-Zellen (CD24+CD38hi+, CD24+CD38int), Gedächtnis B Zellen (CD24+CD27+), Plasmablasten (CD38+CD27+) sollen bezüglich der IL-35 und IL-10 Produktion nun untersucht werden. Dafür wurden aufgereinigte humane B-Zellen mit

CpG+CD40L oder *R848+CD40L* für 3 Tage und *PMA + Ionomycin + Monensin* in den letzten 4 h stimuliert. Nach Setzen eines Gates auf diese Subpopulationen wurde die prozentuale IL-35+/IL-10+ B Zellen an der Gesamtpopulation gemessen. Je höher der Anteil von IL-35+/IL-10+ B Zellen, desto höher wahrscheinlich ist die Fähigkeit dieser Subpopulation IL-35/IL-10 zu produzieren.

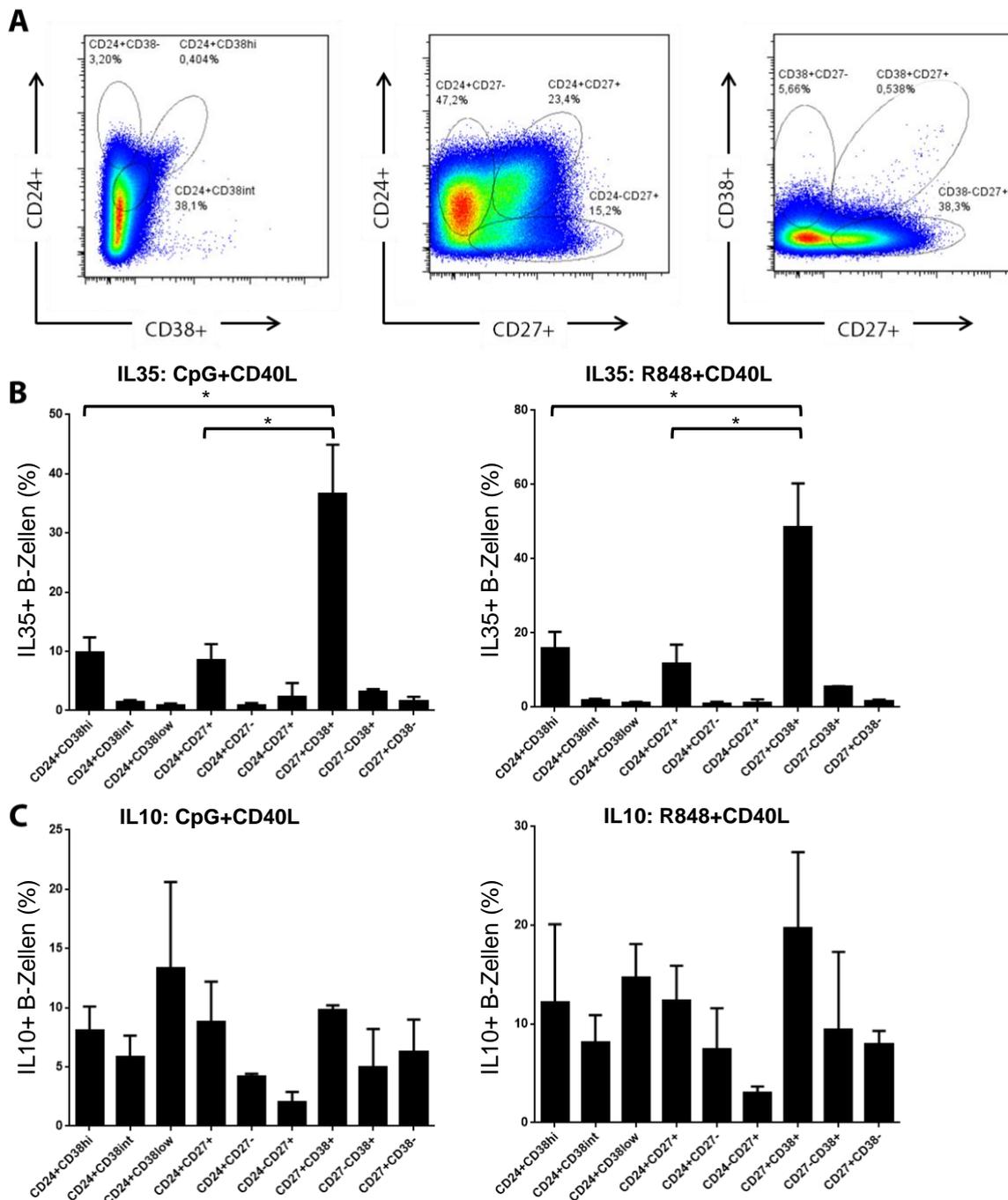


Abb. 12 Charakterisierung von IL-35/IL-10 B-Zellsubpopulationen. B Zellen wurden mit CpG+CD40L bzw. R848+CD40L für 3d stimuliert, in den letzten 4h wurde PMA + Ionomycin + Monensin für die intrazelluläre FACS Analyse hinzugefügt. **A:** FACS Dotplot zur Darstellung aller Subpopulationen mit Gate. **B:** Prozentualer Anteil IL-35 produzierender B Zellen. CD27+CD38+ B Zellen haben signifikant

den größten Anteil an B35-Zellen. Mittelwerte und SD von 3 Experimenten. **C:** Prozentualer Anteil IL-10 produzierender B Zellen. Relativ sind CD24+CD27+ und CD38+CD27+ Hauptproduzenten von IL-10. Mittelwerte und SD von 2 Experimenten.

Sowohl bei der Stimulation mit CpG+CD40L und R848+CD40L beobachtet man eine Dominanz der IL-35 Produktion in den differenzierten Subpopulationen, nämlich bei transitionalen B-Zellen (CD24+CD38hi+), Gedächtnis B-Zellen (CD24+CD27+) und Plasmablasten (CD38+CD27+), wobei Plasmablasten signifikant am meisten IL-35 produzieren (s. Abb. 12). Man stellt jedoch fest, dass keine Beschränkung der IL-35-Expression auf eine spezifische B-Zell-Subpopulation besteht. Die Fähigkeit zur Produktion ist auch in transitionalen B-Zellen und Gedächtnis B-Zellen gegeben. Die IL-10 Analyse der B Zellen hingegen zeigt eine inhomogene Verteilung der Oberflächenmarker-Expression. Betrachtet man die Ergebnisse relativ, produzieren Gedächtnis B-Zellen (CD24+CD27+CD38low) und Plasmablasten (CD38+CD27+) am meisten IL-10. Die transitionalen B Zellen (CD24+CD38hi+) sind im Vergleich in diesen Stimulationen nicht dominant in der IL-10 Produktion.

4.2.3.2 ELISA Analyse

Die Ergebnisse aus den Vorkapiteln zeigen eine Dominanz der Oberflächenmarker CD38 und CD138 bei B35 Zellen auf. Um diese Marker zu bestätigen, müssen CD138+ und CD38+ B-Zellen im ELISA signifikant mehr IL-35 produzieren als CD138- und CD38- B-Zellen. CD138+CD38+ B-Zellen bzw. auch CD38+CD27+ B-Zellen gehören charakteristischerweise zu den Plasmazellen bzw. als Vorstufe in Form von Plasmablasten. Die Hypothese, dass Plasmablasten/Plasmazellen zu den regulatorischen B35 Zellen gehören, soll im Folgenden gezeigt werden.

In einem Orientierungsexperiment wurden eine hohe Menge an CD38+CD27+ B-Zellen (Plasmablasten) durch eine 7 tägige Stimulation von PBMCs mit R848+IL2 erzielt. Parallel wurden 7 Tage lang unstimulierte PBMCs in Kultur gehalten. Eine FACS Analyse zeigt eine starke Anhebung der CD38+CD27+ B-Zell Population (Plasmablasten) gegenüber der nicht stimulierten Kultur. Ein ELISA der Überstände der beiden Kulturen zeigt eine signifikante Erhöhung der IL-35 Produktion (s. Abb. 13).

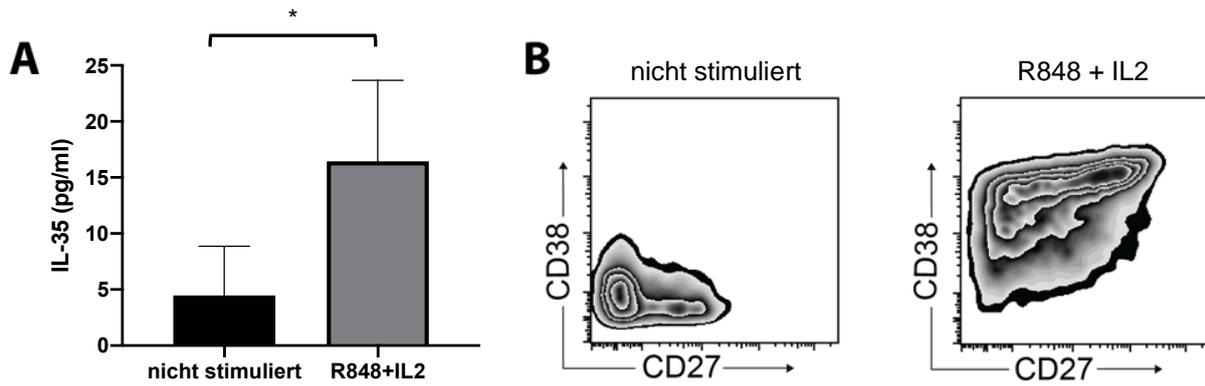


Abb. 13 Stimulierte PBMCs produzieren mehr IL-35 als unstimulierte PBMCs. PBMCs wurden 7d lang mit R848+IL2 stimuliert, B-Zellen sind zu Plasmablasten (CD38+CD27+) differenziert. **A:** IL-35 ELISA von Überständen aus 7d Stimulation von PBMCs und 7d unstimulierten PBMCs. (kombinierte Daten von 3 unabhängigen Experimenten, Mittelwert \pm SD, unpaired t-test). **B:** FACS Analyse von 7d stimulierten PBMCs und unstimulierten PBMCs bezüglich CD38/CD27 Expression.

Im nächsten Schritt wurde nach einer 7 tägigen Stimulation von PBMCs eine B-Zellisolation und eine CD38 Separation durchgeführt. Aufgrund der langen Stimulation war die CD38-negative Population nach dem CD38-Separationsverfahren zellzahlmäßig so gering, dass im Rahmen der gleichen Blutabnahme kryokonservierte unstimulierte PBMCs des gleichen Spenders verwendet werden mussten. Aus diesen PBMCs wurden B-Zellen isoliert, die im FACS eine eindeutige CD38-negative Population gegenüber der CD38+-separierten B Zellen vorweisen. Die CD38+ und CD38- Population wurde folglich mit PBS gewaschen und 1 Tag in Kultur gehalten. Die Analyse des daraus gewonnenen Überstands mittels ELISA zeigt eine signifikante Erhöhung der IL-35 Produktion der CD38+ B-Zellpopulation gegenüber der unstimulierten B Zellen, die vornehmlich eine CD38- Expression vorweisen (s. Abb. 14).

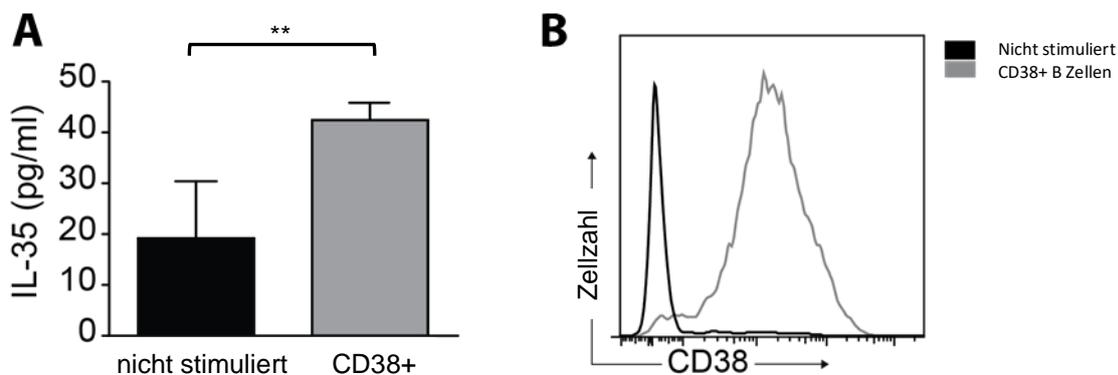


Abb. 14 CD38+ B-Zellen produzieren signifikant mehr IL-35 als nicht stimulierte B-Zellen. PBMCs wurden 1 Woche mit R848+IL2 stimuliert und in CD19+CD38+ B Zellen isoliert. Als CD38- B Zellen wurden B-Zellen aus kryokonservierten PBMCs vom gleichen Experiment benutzt. **A:** IL-35 ELISA mit Überstand aus 1d unstimulierten Kultur der CD38+/CD38- B Zellen. Signifikante Erhöhung der IL-

35 Produktion in CD38+ B Zellen. (kombinierte Daten von 3 unabhängigen Experimenten, Mittelwert \pm SD, unpaired t-test). **B:** FACS Reinheitsanalyse der CD38+ B Zellen und der nicht stimulierten B Zellen. Histogramm der Expression von CD38. Es zeigt sich eine klare Induktion von CD38 auf B-Zellen gegenüber nicht stimulierten B-Zellen.

Um die Plasmablasten/Plasmazellen-Hypothese zu bekräftigen wurde der Oberflächenmarker CD138 untersucht. Nach einer zweitägigen Stimulation mit CpG und CD40L wurden CD138+ und CD138- B-Zellen separiert. Eine FACS Analyse zeigt die Reinheit der Zellseparation (s. Abb. 15B). Nach Waschen mit PBS der CD138+ und CD138- B Zellen wurden die Zellen 1 Tag in Kultur gehalten. Die Analyse des daraus gewonnenen Überstands mittels ELISA zeigt eine Erhöhung der IL-35 Produktion der CD138+ B Zellpopulation, die womöglich aufgrund der kurzen Stimulationsdauer nicht eindeutig signifikant war (s. Abb. 15A).

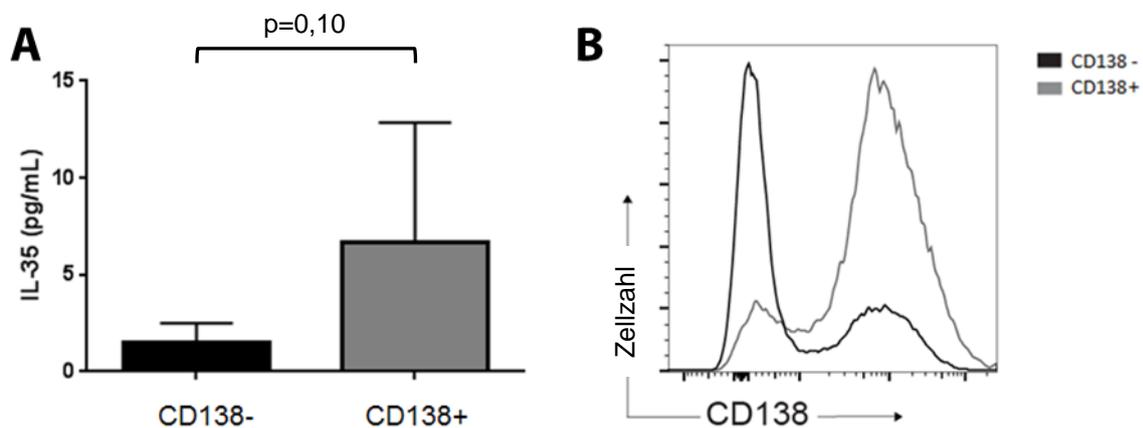


Abb. 15 IL-35-Freisetzung von CD138+ und CD138- B-Zellen. Stimulation von B Zellen mit CpG+CD40L für 2d. Separation von CD138+ und CD138- B Zellen mit anschließender unstimulierter Kultur über 1d. **A:** IL-35 ELISA des 1d Überstands von CD138+ und CD138- B Zellen. CD138+ B Zellen produzieren mehr IL-35 p=0,10. (kombinierte Daten von 3 unabhängigen Experimenten, Mittelwert \pm SD, unpaired t-test). **B:** FACS-Analyse der als CD138+ und CD138- bezeichneten Zellpopulationen.

Zusammenfassend konnte bestätigt werden, dass CD138+, CD38+ und CD38+27+ B Zellen im ELISA eine erhöhte Produktion von IL-35 aufweisen. Die Erkenntnisse vorheriger Ergebnisse zeigen, dass regulatorische B-Zellen wahrscheinlich nicht einer bestimmten B-Zell-Subpopulation entsprechen, sondern in vielen B-Zell-Teilmengen mit einem Übergewicht in Plasmablasten und Plasmazellen induziert werden können.

4.2.4 Plasmazytom Zelllinie JK6L produziert IL-35

Plasmazytom Zellen entstehen aus einer tumorhaften monoklonalen Vermehrung von Plasmazellen. Basierend auf der Erkenntnis, dass Plasmablasten bzw. Plasmazellen wichtige

IL-35-Produzenten darstellen, wurde die JK6L-Plasmazytom Zelllinie 24h ohne Stimulation kultiviert und der Überstand in einem IL-35 ELISA untersucht wird.

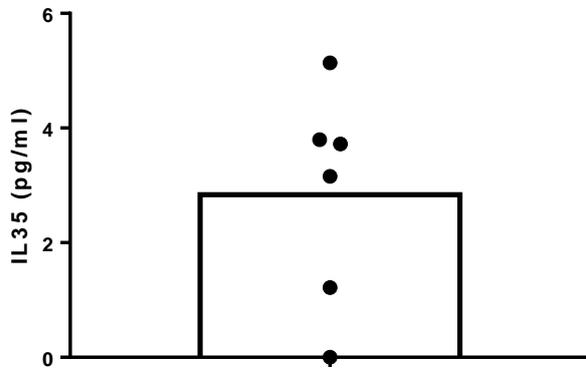


Abb. 16 Plasmazytom Zelllinie JK6L produziert IL-35. 24h Kultur ohne Stimulation. IL-35 ELISA des Überstands.

5 von 6 verschiedene Kulturen der Plasmazytom Zelllinie JK6L zeigen positive IL-35 Produktion (s. Abb. 16), wobei die Werte jedoch sehr niedrig waren. Damit kann im ELISA gezeigt werden, dass Plasmazelllinien IL-35 produzieren können.

4.2.5 Gegenüberstellung des Phänotyps von B35 und B10 Zellen

Die Tatsache, dass regulatorische B35 und B10 Zellen ähnlichen B-Zell Phänotyp und Oberflächenmarkerprofil zeigen, wirft die Frage auf, inwiefern B35-Zellen gleichzeitig IL-10 bzw. umgekehrt B10-Zellen auch IL-35 produzieren können. Dafür wurden PBMCs 2 Tage lang mit R848+IL2 stimuliert, anschließend B-Zellen isoliert und für 4 h mit PMA und Ionomycin stimuliert. In der FACS Analyse wurde jeweils ein Gate auf IL-35+ und IL-10+ B Zellen gesetzt und deren umgekehrte Expression von IL-10 und IL-35 gemessen. Dabei hat sich herausgestellt, dass über 95% der B35-Zellen B10-Zellen entsprechen und umgekehrt (s. Abb. 17). Die Annahme, dass es sich hierbei um den ähnlichen Phänotyp handelt, kann durch vorige Untersuchungen der Oberflächenmarker von B35 und B10 Zellen bestätigt werden. Jedoch müssen bei dieser Annahme die Art der Stimulation berücksichtigt werden, die B-Zellen in der Entwicklung beeinflussen, beispielsweise Stimulationsprotokolle, die B-Zellen bevorzugt zu Plasmablasten oder Gedächtnis B-Zellen stimulieren.

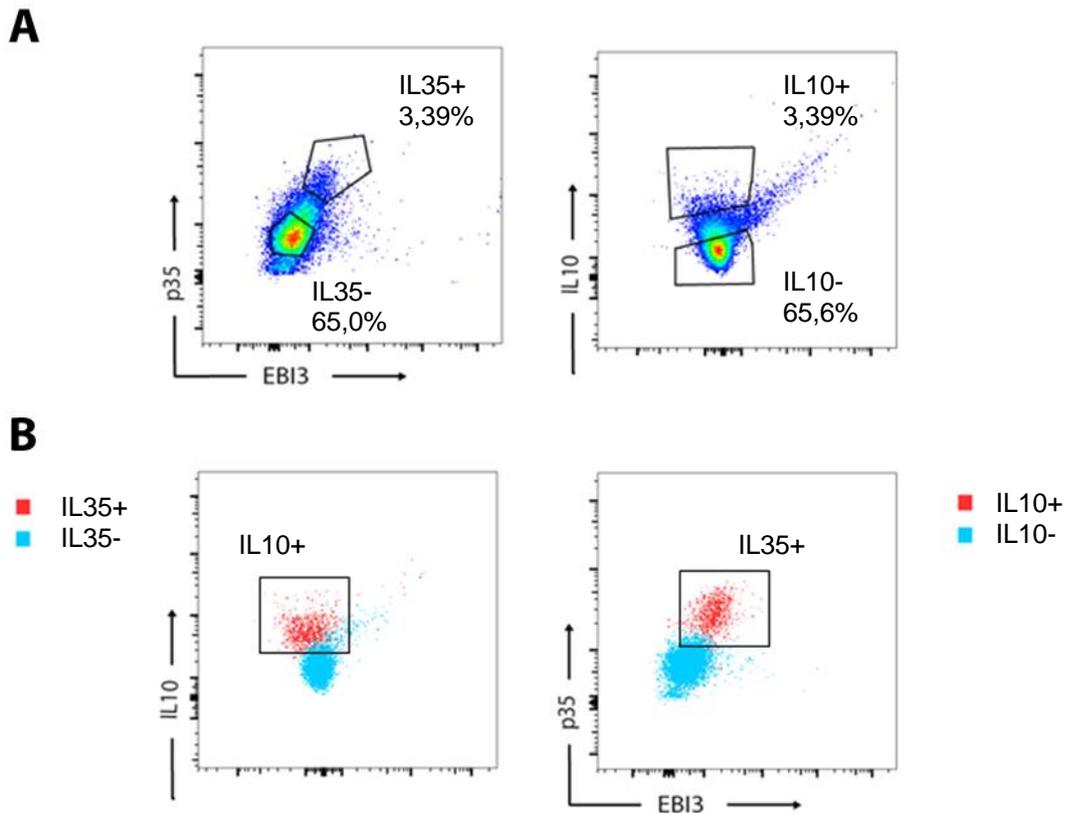


Abb. 17 IL-35+IL-10 Co-Färbung von B Zellen. PBMCs 2d mit R848+IL2 stimuliert, anschließend daraus B Zellen isoliert und in den letzten 4 h PMA + Ionomycin + Monensin hinzugegeben. **A:** Intrazelluläres FACS. Gate auf IL-35+ und IL-10+. **B:** IL-35+ oder IL-10+ gatedete Zellen wurden betrachtet und auf deren umgekehrte IL-10/IL-35 Expression untersucht. Beispielsauszug aus einer Versuchsreihe aus 3 unabhängigen Experimenten.

4.3 Einfluss von Fingolimod auf regulatorische B Zellen

4.3.1 Fingolimod erhöht B10 und B35 Zellen in vitro

In Anlehnung an bereits vorbeschriebene pleiotrope Effekte neben Lymphozyten-Sequestrierung und Neuroprotektion, soll in vitro der Einfluss einer Fingolimod (FTY)-Behandlung auf die B-Zell-Differenzierung im Folgenden identifiziert werden. Da FTY720 in der Zellkultur nicht effizient wie in Blut und Gehirn phosphoryliert wird, wird eine vorphosphorylierte Verbindung (FTY-P) benutzt. Diese wird den B-Zellen hinzugefügt, die mittels Kokultur mit CD40L-exprimierenden Fibroblasten und CpG oder R848 für 3 Tage stimuliert werden. PMA und Ionomycin wurden für die letzten 4 h der Kultur hinzugegeben und die IL-35/IL-10-Produktion durch intrazelluläres FACS bestimmt. Bei den 2 möglichen Stimulationen (CpG+CD40L; R848+CD40L 3 Tage) erhöht sich der Anteil der B35/B10 Zellen unter Einfluss von FTY-P. Insbesondere bezüglich IL-10 zeigt die Stimulation mit R848+CD40L+FTY-P im Vergleich zur Stimulation ohne FTY-P eine signifikante Erhöhung

(s. Abb. 18). Jedoch wurden für IL-35 nicht genügend Replikate untersucht, sodass eine statistische Berechnung nicht möglich war.

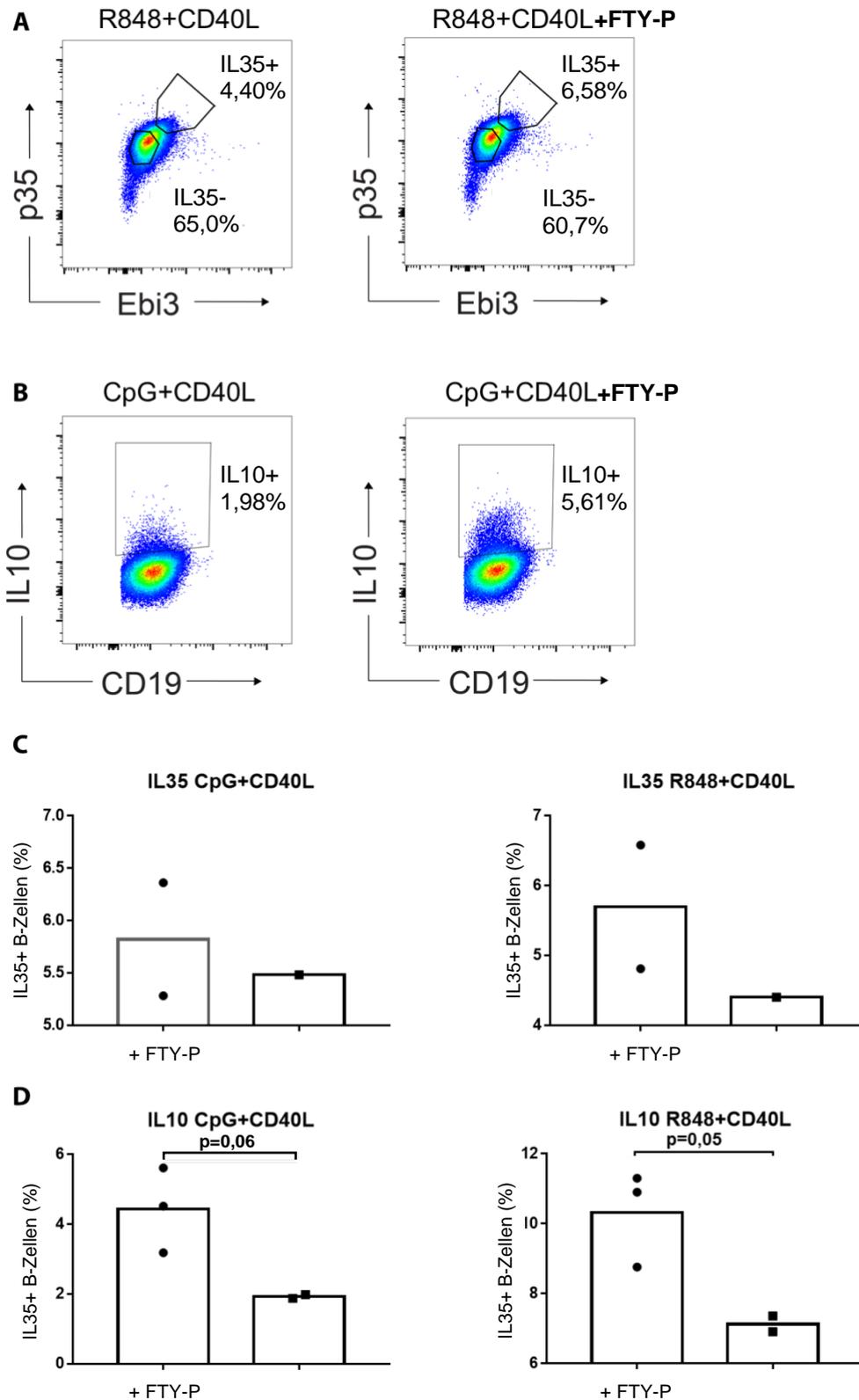


Abb. 18 FTY erhöht prozentual die IL-35/IL-10 Zellzahl. B Zellen wurden 3d mit CpG+CD40L+/-FTY oder R848+IL2+/-FTY stimuliert. Für die letzten 4h wurde PMA + Ionomycin + Monensin

mit oder ohne FTY-P stimuliert und in den letzten 4 h PMA und Ionomycin hinzugegeben. In einer FACS Analyse wurde die MFI der CD38 Expression der beiden Gruppen verglichen.

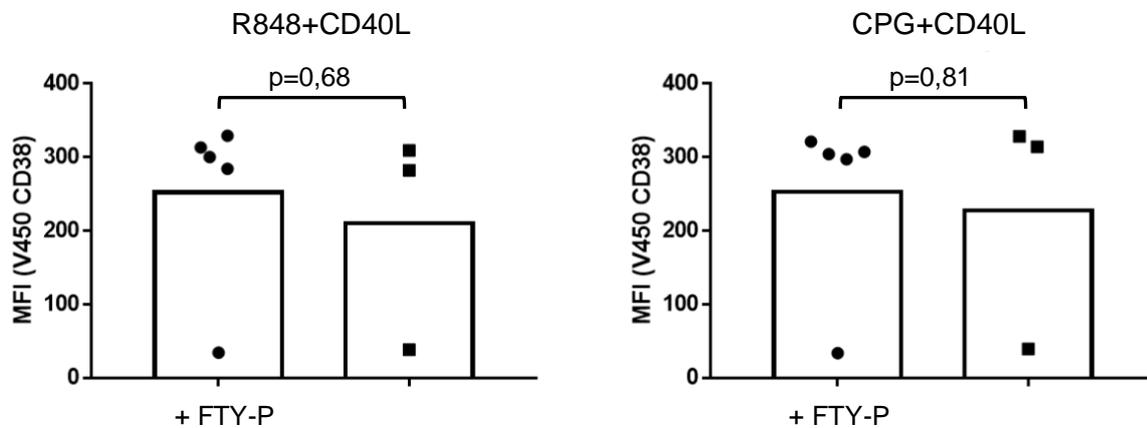


Abb. 20 FTY-P hat keinen Einfluss auf die CD38 Expression von B Zellen. B Zellen wurden mit R848+CD40L oder CpG+CD40L für 3 Tage mit PMA + Ionomycin + Monensin in den letzten 4h stimuliert. Zusätzlich wird mit oder ohne FTY-P stimuliert. Unpaired t-test.

FTY-P kann nicht signifikant die CD38 Expression steigern (s. Abb. 20). Für CD24 und CD27 konnte ebenfalls keine Änderung der Expression gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Somit kann FTY-P die B-Zelldifferenzierung nicht eindeutig fördern.

4.4 Klinische Relevanz von IL-35 bei MS Patienten

4.4.1 IL-35 Werte sind vermindert im Plasma von MS Patienten

Die klinische Relevanz von IL-35 im Krankheitsbild der Multipler Sklerose soll in Patientenproben mittels IL-35 ELISA untersucht werden. CSF als Messsubstanz zeigte sich in einem Vorversuch als ungeeignet: Bei 4 ANE Patienten wurde mit dem verwendeten ELISA keine bzw. zu niedrige IL-35-Werte detektiert. In einem weiteren Vorversuch wurde die Messbarkeit von IL-35 in Serum und Plasma verglichen. Dabei lassen sich IL-35-Werte bei gleichen Probanden im Plasma deutlich höher als im Serum nachweisen (siehe Abb. 21A). Die Analyse der IL-35 Spiegel erfolgte im Folgenden daher im Plasma von 52 unbehandelten MS-Patienten (CIS: n = 18, RR-MS: n = 21, SP-MS: n = 13) und unbehandelte Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen (ANEs: n = 25) oder andere entzündliche neurologische Erkrankungen (AENEs) (n = 13). ANE Patienten beinhalten Krankheitsbilder wie Schwindel, Hörsturz, Migräne, zerebrovaskuläre Erkrankung, Spinalstenose, sensorische Missempfindungen oder intrakranielle Hypertension. Diese Krankheiten stehen in keinem Zusammenhang zu Autoimmunerkrankung und werden deshalb als Kontrollpatienten gewertet. AENE enthält andere autoimmune neurologische Erkrankungen, wie Morbus Bechterew,

Granulomatose mit Polyangiitis, SLE, Sarkoidose, Sjögren Syndrom. Diese Krankheiten stellen andere autoimmune Erkrankungen dar, die mit der Multiplen Sklerose verglichen werden können.

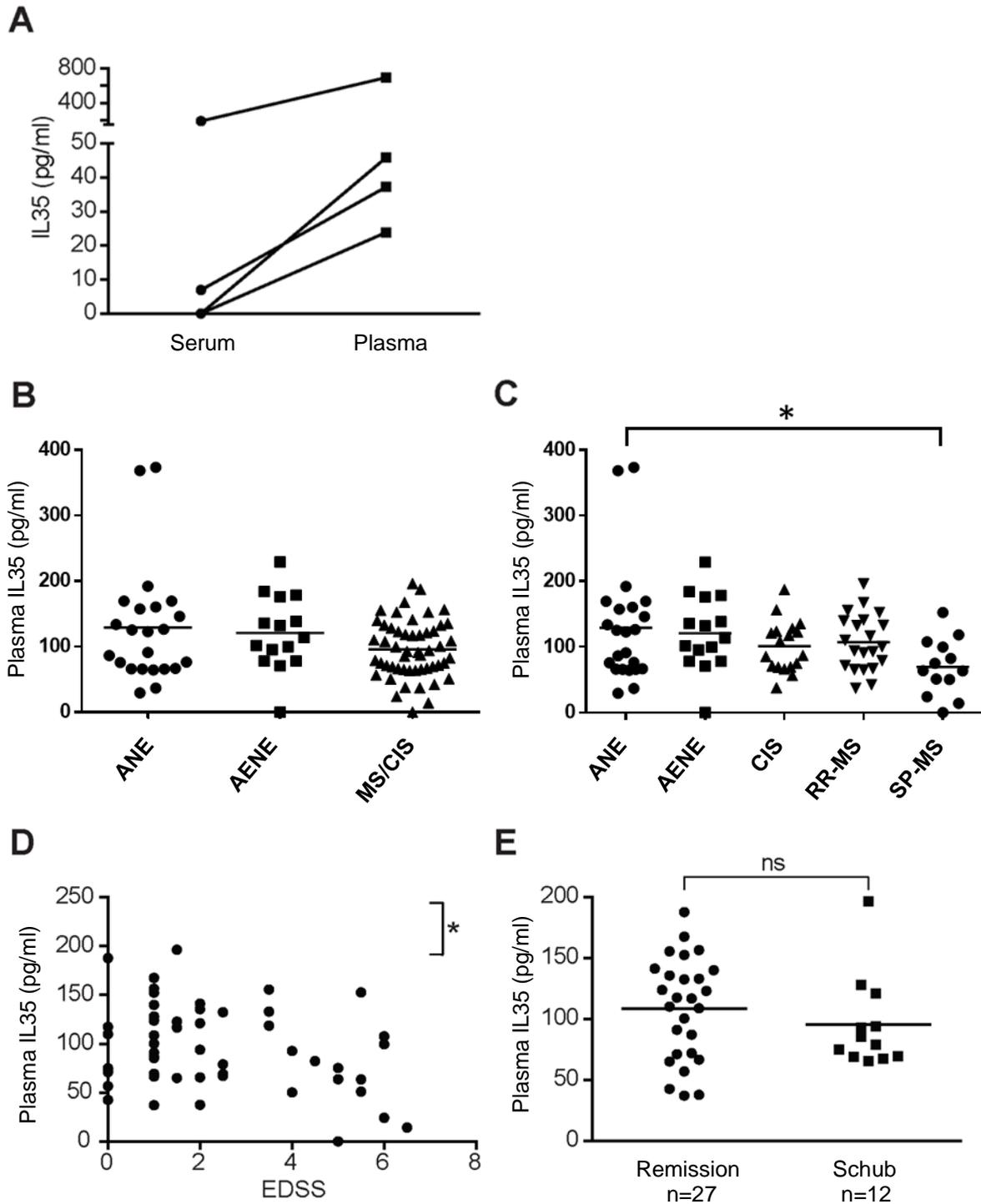


Abb. 21 IL-35 Werte bei MS Patienten sind vermindert. IL-35 wurde gemessen von MS-Patienten (CIS: n = 18, RR-MS: n = 21, SP-MS: n = 13), unbehandelte Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen (ANEs: n = 25) und andere entzündliche neurologische Erkrankungen (AENEs) (n = 13). **A:** IL-35 ELISA von 4 gesunden Probanden. IL-35 kann in Plasma besser detektiert werden als im Serum. **B:** IL-35 ELISA. MS/CIS Patienten haben niedrigere IL-35 Werte als ANE (Kontrolle), die

jedoch nicht signifikant waren, ANOVA und *Dunn's multiple comparisons test* **C**: MS Patienten wurden in Subgruppen aufgeteilt. SP-MS Patienten zeigen signifikant am wenigsten IL-35, ANOVA und *Dunn's multiple comparisons test* **D**: EDSS Score in Relation zur IL-35 Plasmalevel. Signifikant indirekte Korrelation. Pearson-Korrelation. **E**: IL-35 Plasmalevel von rezidivierenden MS Patienten haben keinen signifikanten Unterschied gegenüber remittierende MS Patienten, unpaired t-test .

MS und CIS Patienten zeigen bei der ELISA Messung reduzierte IL-35 Werte im Plasma gegenüber ANE Patienten, wobei der Unterschied nicht signifikant war (s. Abb. 21B). AENE Patienten zeigen zwar ebenfalls geringere IL-35 Plasmawerte, jedoch sind diese höher als bei den MS Patienten. Eine Unterscheidung innerhalb der MS Patienten in CIS, RR-MS und SP-MS stellt signifikant reduzierte IL-35 Werte bei SP-MS Patienten gegenüber ANE Patienten dar (s. Abb. 21C). SP-MS Patienten zeigen allerdings auch niedrigere Werte als RR-MS und CIS Patienten, was darauf schließen lässt, dass mit der Schwere der Erkrankung der IL-35 Plasmaspiegel sinkt. Um diese Aussage zu bestätigen, wurde die erweiterte Disability Status Scale (EDSS) der Patienten mit ihren IL-35 Werten verglichen. Der EDSS ist eine von John F. Kurtzke entwickelte Leistungsskala, die den Schweregrad der Behinderung bei MS-Patienten zum Zeitpunkt der Erhebung angibt und spiegelt somit neurologische Funktionen der MS Patienten wider. Es stellt sich heraus, dass eine signifikant umgekehrte Korrelation zwischen dem EDSS und IL-35 Spiegel im Plasma besteht (s. Abb. 21D). Ein Vergleich der IL-35 Spiegel bei Patienten in Remission versus Patienten im Schub zeigt keinen signifikanten Unterschied (s. Abb. 21E).

4.4.2 Fingolimod und Rituximab haben keinen eindeutigen Einfluss auf IL-35 und IL-10 Plasmawerte bei Multiple Sklerose Patienten

Um die Wirkung der Fingolimod-Behandlung auch *in vivo* zu bewerten, wurden IL-35-Plasmaspiegel vor und während einer Fingolimod-Behandlung von 42 MS-Patienten bestimmt (s. Abb. 22). Hier konnten wir keine Eindeutigkeit der IL-35 Verlaufswerte unter Fingolimod Behandlung herausfinden. Bei 16 Patienten konnte ein Anstieg der IL-35 Werte beobachtet werden, bei 14 Patienten sinken die Werte. Bei 12 Patienten sind keine IL-35 Werte messbar. Darüber hinaus zeigt sich bei Rituximab Behandlung ebenfalls keine eindeutige Tendenz nach Behandlung. Dies gilt auch bezüglich der IL-10 Produktion. An dieser Stelle muss tatsächlich angeführt werden, dass hier keine Differenzierung der MS-Subtypen oder Einteilung in EDSS Scores stattgefunden hat, die eine homogenen Vergleich ermöglichen können. Ebenso ist auffällig, dass bei Messung der IL-10 Serumwerte, am ehesten aufgrund der Probenqualität, viele IL-10 Werte nicht messbar waren. IL-35 als universaler Marker für Behandlungserfolg oder Schwere einer Autoimmunerkrankung konnte mit diesem Experiment nicht gezeigt werden.

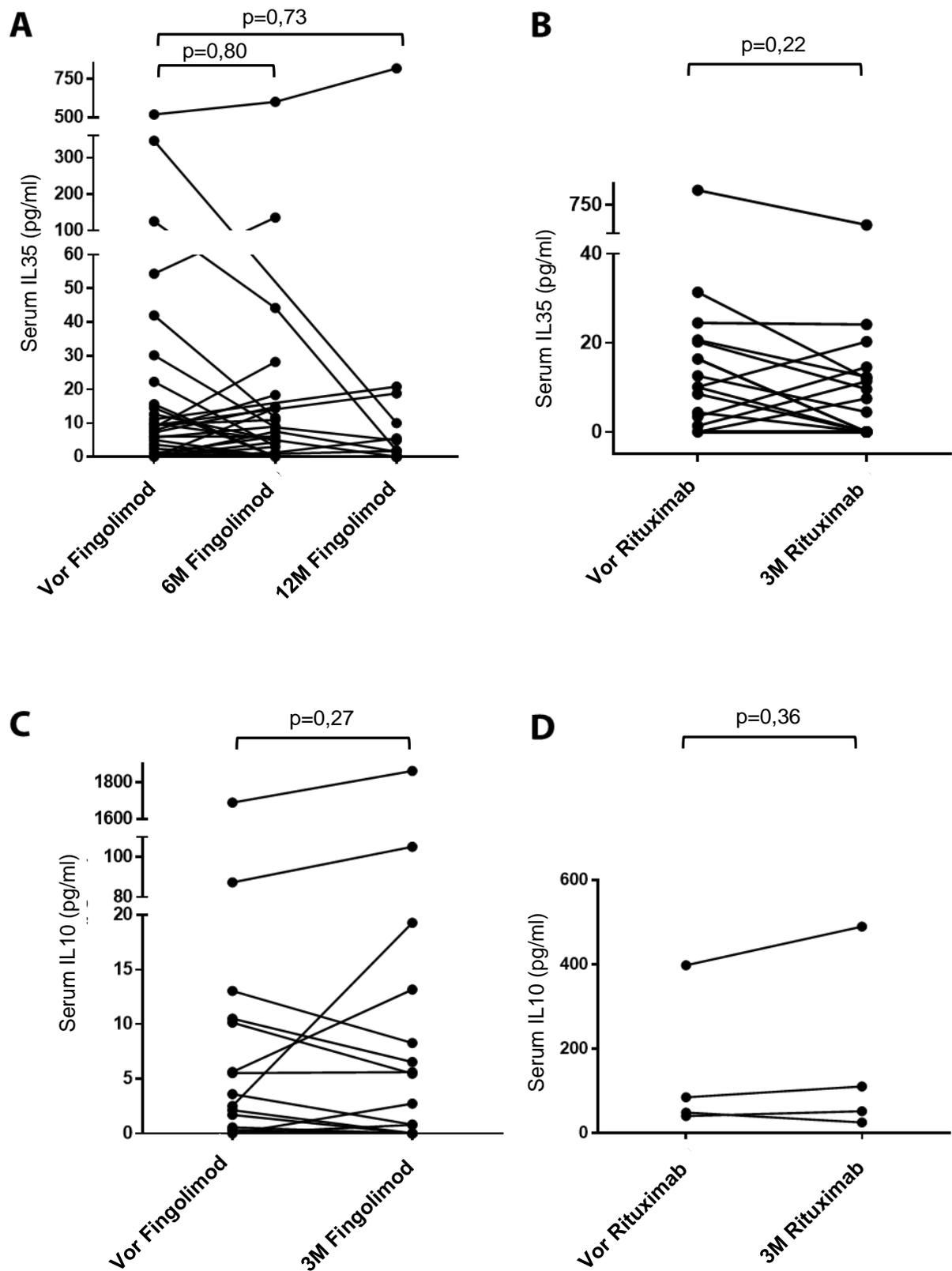


Abb. 22 IL-35/IL-10-Plasmawerte von MS Patienten vor und nach Fingolimod bzw. Rituximab Behandlung. A+B: IL-35 ELISA. C+D: IL-10 ELISA. 3M, 3 Monate Behandlung; 6M, 6 Monate Behandlung; 12M, 12 Monate Behandlung. (paired t-test)

5 Diskussion

5.1 Regulatorische B-Zellen

5.1.1 Phänotyp

Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse dieser Arbeit mit anderen Forschungsarbeiten von humanen und murinen B10-Zellen zeigt eine Vergleichbarkeit der Daten der Oberflächenmarker-Typisierung. In der Literatur gehören zum B10-Phänotyp neben T2 transitionale B-Zellen [41, 131], Marginalzonen-B-Zellen [45], auch CD138⁺-Plasmazellen [46, 47] und Plasmablasten [48]. Beim Menschen wurden sowohl CD19⁺CD24⁺CD38⁺ [37, 39] als auch CD19⁺CD24⁺CD27⁺ [40] B10-Zellen identifiziert. Letztere B-Zell-Untergruppen konnten mit unseren Ergebnissen bestätigt werden. Hingegen ist die Identifikation muriner B35-Zellen noch nicht abgeschlossen. In einer Arbeit zeigten IL-35 depletierte Mäuse eine vermehrte Exazerbation einer EAE im Vergleich zu Wildmäusen. In dieser Arbeit wurden CD138 positive Plasmazellen als murine B35-Zellen identifiziert [47, 48, 63]. In der vorliegenden Dissertation wurden die Untersuchungen auf menschliche B-Zellen erweitert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass B35-Zellen sowohl bei Mäusen als auch bei Menschen vermehrt bei Plasmablasten/Plasmazellen zu finden sind. Die Vorstellung, dass Antikörperproduzierende B-Zellen auch Regulatoren von Immunantworten sind, ist schwer mit dem Wissen zu vereinbaren, dass diese Zellen im Zusammenhang mit Autoimmunität oder Allergie oft pathogen sind. Somit wäre es möglich, dass eine spezielle Untergruppe von Plasmablasten die Balance der Entzündungsreaktion aufrechterhält. Die Forschungsarbeit von Matsumoto et al 2014 ist diesem Gedanken nachgegangen und hat den Nachweis erbracht, dass IL-10-produzierende Plasmablasten aus naiv unreifen B-Zellen und nicht aus höher differenzierten Gedächtnis-B-Zellen stammen [48]. Dabei wurde die Stimulation von drei großen Populationen aus frischen PBMCs untersucht, nämlich CD24⁻CD27⁻CD38⁻ (naiv reif), CD24⁺CD27⁻CD38⁻ (naiv unreif) und CD24⁺CD27⁺CD38⁻ (Gedächtnis-B-) Zellen. Als Ergebnis stellte sich heraus, dass der Grad der Differenzierung der Plasmablasten in Relation zur regulatorischen Fähigkeit steht. Je höher CD27 exprimiert wird (CD27^{hi}), was ein höheren Reifungsgrad der Plasmablasten entspricht, desto weniger fällt die IL-10-Produktion aus. Die höchste regulatorische Fähigkeit wurde in den intermediär exprimierenden CD27⁺ (CD27^{int}) Plasmablasten festgestellt, die sich als eine klar abzutrennende B-Zell-Untergruppe differenzieren lässt. Interessanterweise wurde erwiesen, dass Plasmablasten, die aus CD24⁺CD27⁺CD38⁻ Gedächtniszellen stammen, wenig bis kein IL-10 sezernieren können. Gedächtnis-B-Zellen wurden überwiegend in CD27^{hi}CD38⁺-Plasmablasten differenziert,

während sich naiv unreife B-Zellen und reife B-Zellen hauptsächlich zu CD27^{int}CD38⁺ - Plasmablasten entwickelten. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass der unmittelbare Vorläufer in der Entwicklung von Plasmablasten (CD27^{int}) die Balance zwischen den Zellen bestimmt, die die Autoimmunität durch Antikörperproduktion einerseits fördern und andererseits durch Produktion regulatorischer Zytokine hemmen. In unseren Untersuchungen konnte keine CD27^{int}- und CD27^{hi}-Population unter den verwendeten Stimulationsprotokollen abgegrenzt werden, jedoch ließ sich eine CD38^{int}- und CD38^{hi}-Population trennen. CD24⁺CD38^{int} B-Zellen konnten in unseren Untersuchungen keine signifikant höhere regulatorische Kapazität zeigen als CD24⁺CD38^{hi} B-Zellen. Eine höhere CD38-Expression erscheint in diesem Punkt keine eindeutige Eigenschaft regulatorischer B10- und B35-Zellen zu sein. Eine Differenzierung der B35-Zellen in „CD27^{int}“ sowie „CD27^{hi}“ und der Vergleich ihrer regulatorischen Kompetenzen stehen noch aus.

In Hinblick auf die Diversität des Breg-Phänotyps laut der These, dass B-Zellen „reaktiv“ in Abhängigkeit des Umgebungsmilieus regulatorische Eigenschaften beziehen, wurde die Betrachtung der weiteren Phänotypen, nämlich CD24⁺CD38⁺ transitionale B-Zellen und CD24⁺CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen, in dieser Arbeit nicht weiterverfolgt. In unseren Experimenten konnte beobachtet werden, dass die Stimulationsart bereits Unterschiede im Phänotyp der B35-Zellen hervorbringt. Die CpG+CD40L bzw. R848+CD40L Stimulation bewirkt bei IL-35⁺ B-Zellpopulationen eine Erhöhung der Expression von CD24 und CD27 gegenüber IL-35⁻ B-Zellen. Die R848+IL2 Stimulation erhöht signifikant die Expression von CD138 und CD38. Iwata beschrieb 2011, dass sich die CD-Expression der B10-Zellen ebenso mit der Länge der Stimulationsdauer ändert. Eine längere Stimulation verursacht eine höhere CD38 Expression der B10-Zellen. In der selbigen Arbeit postulierte er einen CD24⁺CD27⁺ Phänotyp von B10-Zellen, wohingegen davon 60 % zusätzlich CD38⁺ waren [40]. Eine Isolierung von humanen CD24⁺CD27⁺ B-Zellen gegenüber CD24⁻CD27⁻ B-Zellen zeigte eine 10-fach erhöhte Produktion von IL-10 nach Stimulierung mit CpG+CD40L ex vivo. In Anlehnung zu den Untersuchungen von Matsumoto et al 2014 wurde hier keine CD27^{int}/^{hi} Differenzierung vorgenommen. Eine Überlegung, ob es sich bei CD24⁺CD27⁺ B10-Zellen tatsächlich um Gedächtnis-Zellen oder um CD24⁺CD27^{int}CD38⁺ Plasmablasten handelt, wurde deshalb nicht nachgegangen. Blair et al konnte 2010 humane IL-10-kompetente B-Zellen nach CD40-Stimulation aus unreifen CD24⁺CD38⁺- transitionalen B-Zellen anreichern [39]. Es wurde festgestellt, dass die Differenzierung von proinflammatorischen CD4⁺ T-Zellen durch CD24⁺CD38⁺ B-Zellen signifikant gehemmt wird. Untersuchungen zur Übertragung

dieser Breg-Phänotypen auf IL-35 sind ausstehend und es bleiben viele offene Fragestellungen, an denen angesetzt werden kann, um den Phänotyp von regulatorischen B35-Zellen weiter einzugrenzen.

5.1.2 Stimulation

Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen humaner und muriner Rekrutierung von regulatorischen B10- und B35-Zellen besteht im Stimulationsansatz. Werden bei Mäusen vornehmlich TLR4- und CD40-Aktivierung als wichtigster Stimulationsreiz betrachtet [36, 39], sind in unseren Untersuchungen TLR7/8/9- mit CD40-Aktivierung die bestmöglichen Stimulationen zur Entstehung humaner B10- und B35-Zellen. Iwata et al hatte 2011 ein ähnliches B-Zell-Stimulationsprotokoll von TLR Agonisten zur Rekrutierung von B10-Zellen veröffentlicht, in dem sich TLR4- und TLR9-Liganden mit CD40L als stärkste Stimulatoren herausgestellt haben [40]. Im Vergleich zu unseren Ergebnissen wurde ein Stimulationsdauer von 24h und 48h im Gegensatz zu unseren 72h gewählt. Ebenso konnte mit unseren Untersuchungen keine signifikante Überlegenheit von LPS (TLR4-Ligand) bei der Rekrutierung sowohl von B10 als auch B35 Zellen dargestellt werden.

5.2 IL-35

Unser derzeitiges Verständnis der Immunbiologie von IL-35 und seinen Untereinheiten (p35 und EBI3) ist noch lückenhaft. Die Detektion des Heterodimers IL-35 gilt bis heute als Herausforderung. Ebenso muss im Schwerpunkt der IL-35 Forschung eine differenzierte Betrachtung der Einzelbausteine p35 und EBI3 erfolgen.

5.2.1 Detektion von IL-35

Die durchflusszytometrische intrazelluläre Analyse der IL-35 Produktion zur Phänotypisierung regulatorischer B-Zellen birgt die Schwierigkeit IL-35 als heterodimeres Zytokin direkt zu detektieren. Da nach aktuellem Stand kein durchflusszytometrischer Antikörper gegen humanes IL-35 zur Verfügung steht, wurden in dieser Arbeit Antikörper gegen die Untereinheiten p35 und EBI3 verwendet. Eine parallele Signalanhebung lässt darauf schließen, dass beide Untereinheiten im Golgi-Apparat der Zelle vorhanden sind. Jedoch sind die Untereinheiten auch Bausteine für andere Zytokine der IL12-Familie. In einem Nebenexperiment wurde die Expression aller Untereinheiten der IL-12 Familie untersucht. IL-27 ist das Heterodimer aus EBI3 und p28. Eine p28-Expression konnte bei humanen B-Zellen nach Stimulation jeweils mit CpG, R848 und IL-21 nicht nachgewiesen werden (Daten hier nicht gezeigt). Damit wurde angenommen, dass humane B-Zellen nicht IL-27-kompetent sind. In der Literatur wird IL-27 bei Menschen vornehmlich von Makrophagen und dendritischen

Zellen produziert [132, 133]. Weiterhin ist die Untereinheit p40 in den obig genannten Versuchsreihen in derart niedrigen Konzentrationen exprimiert, dass sie in manchen Versuchsdurchläufen kaum zu detektieren ist. In der Literatur konnte bei Versuchen mit murinen B-Zellen die niedrige Expression reproduziert werden. Dementsprechend wird angenommen, dass B-Zellen p40 ebenso nicht exprimieren [47]. Eine Relevanz für IL-12 konnte in unseren Versuchen deshalb nicht dargestellt werden. Diese Überlegungen lassen uns zu dem Schluss kommen, dass eine parallele Expression von p35 und EBI3-Protein in B-Zellen IL-35 spezifisch ist. Um eine eindeutige Aussage zu treffen, müssen die Versuche dieser Dissertation mit Hilfe eines IL-35-spezifischen FACS-Antikörpers wiederholt werden. In einem anderen Aspekt muss angeführt werden, dass die ELISA-Detektion von IL-35 mit dem benutzten ELISA-Kit höhere Signale im Plasma-Blut auslöst als im Serum. Wir vermuten, dass durch den Gerinnungsprozess und aktivierten Gerinnungsfaktoren im Serum IL-35-Proteinbindungen am Thrombus ablaufen und somit IL-35 nicht zu detektieren ist. Wir empfehlen die Nutzung von Plasma für die Detektion, obwohl seitens der Firma sowohl Serum und Plasma als Materialien geeignet sind.

5.2.2 Betrachtung der Homodimeren und Monomeren von p35 und EBI3

Unterschiede in der intrazellulären Signalaktivierung durch STAT-Systeme nach IL-35 Bindung an den Rezeptoren von T- und B-Zellen lässt mutmaßen, dass IL-35 entweder unterschiedliche Rezeptoren bedient oder dass die IL-35-Konfiguration bzw. sogar das Vorhandensein von p35:p35- und EBI3:EBI3-Homodimeren Einflüsse auf unterschiedliche STAT-Aktivierung besitzen [63]. Es ist nachgewiesen, dass einzelne Untereinheiten der IL-12-Familie nicht nur als Heterodimere, sondern auch als Monomere oder Homodimere auftreten und autonom funktionieren können. Beispielsweise wurde gezeigt, dass p35 in einem experimentellen Modell für Arthritis die Aufgabe als negativer Regulator der proinflammatorischen IL-27-Reaktionen besitzt [134]. Auf ähnlicher Weise sind p40 sowie p40:p40-Homodimere im Serum von MS-Patienten mit der Progression neurologischer Dysfunktionen durch Hemmung der Tregs und Förderung von Mechanismen der ZNS-Demyelinisierung verbunden [135]. Aufgrund des Fehlens von Disulfid-Brücken im IL-35-Heterodimer gibt es Hinweise, dass p35 und EBI3 als unabhängige Untereinheiten sezerniert werden [136]. Berichte weisen darauf hin, dass beide Untereinheiten erst bei Entzündungszuständen das bioaktive Heterodimer bilden [51]. Diese Untersuchungen lassen auf eine zusätzliche Komplexitätsschicht schließen, die der physiologischen Regulation von IL-35 zugrunde liegen könnte. Die Feststellung, dass p35 und EBI3 als einzelne Untereinheiten

die Lymphozytenproliferation hemmen und p35 im geringen Maße Breg- oder Treg-Zellen induzieren kann [137], legt nahe, dass p35 und EBI3 IL-35-unabhängige Funktionen besitzen und möglicherweise eine neue Klasse therapeutischer Zytokine darstellen, die es zu untersuchen gilt. Der eindeutige Nachweis von Homodimeren oder Monomeren mittels Durchflusszytometrie konnte in unserer Arbeit nicht erbracht werden. Zwar wurden B-Zellen durch getrennte Detektion von p35 oder EBI3 nachgewiesen; ob es sich jedoch dabei um Monomere oder Homodimere handelt, kann nur mit spezifischen p35:p35- und EBI3:EBI3-Antikörper sicher festgestellt werden, die bisher noch nicht produziert worden sind .

5.2.3 Therapeutische Relevanz von rekombinantem IL-35 und p35

Eines der Ziele der IL-35-Forschung liegt in der Herstellung sowie in der Sicherheit der Anwendung eines Arzneimittels zur Therapie autoimmuner Erkrankungen. Wang et al. untersuchten 2014 *in vivo* Effekte von rekombinantem IL-35 (rIL-35) bei auf Mäusen mit experimenteller autoimmunen Uveitis (EAU), einem autoimmunen Krankheitsbild mit Entzündung der Neuroretina [63]. Basierend auf den Ergebnissen, dass rIL-35 *in vitro* die prozentuale B35-Population anhebt, wurden EAU-Mäusen mit rIL-35 injiziert. Als Ergebnis trat eine Verbesserung der Uveitis bei EAU-Mäusen auf, die mit rIL-35 behandelt wurden. Dambuza et al führte 2017 die Untersuchungen mit rekombinanten p35 sowie p35:p35-Homodimeren und rekombinantem EBI3 bei EAU-Mäusen fort [137]. Es konnte festgestellt werden, dass extrinsisch injiziertes p35 sowie p35:p35 eine biologische Aktivität haben, indem nachweislich B- und T-Zell-Proliferation gehemmt, Tregs sowie Bregs induziert und die EAU im klinischen Bild supprimiert werden konnte. Die Frage nach der intrinsischen bzw. physiologischen Produktion von p35 und p35:p35 sowie EBI3:EBI3 konnte nach LPS-Injektion von Wildmäusen nachgewiesen und somit deren *in vivo*-Existenz gezeigt werden. 2017 konnte Choi et al. die gleichen Überlegungen auf das EAE Modell übertragen und die Ergebnisse auf EAE bestätigen [138]. Es sollte jedoch die mühsame Herstellung von rekombinantem IL-35 erwähnt werden. In diesem Punkt zeigt sich rekombinantes p35, das teilweise identische immunsuppressive Schlüsselfunktionen von IL-35 beinhaltet [137], als bessere Alternative zur Therapie autoimmuner Erkrankungen. Zwar ist zur Behandlung einer Autoimmunerkrankung eine längere Aufrechterhaltung des stabilen p35:EBI3-Komplexes wünschenswert, jedoch birgt dieser physikalische Zustand das Risiko, Antitumor-Immunantworten durch erhöhte regulative Effekte zu unterdrücken oder die Wirksamkeit von Impfstoffen gegen Infektionskrankheiten zu beeinträchtigen. Andererseits ist die Vorhersage einer zufälligen Paarung von p35 oder EBI3 mit anderen Proteinen der IL-12-Familien-Untereinheiten wie p19, p28 oder p40 schwierig und ebenso besorgniserregend, was durch die jüngste Entdeckung von IL-39 unterstrichen wurde,

einer neuartigen Kombination von EB13 und p19, die entzündungsfördernde Reaktionen bei Lupus-ähnlichen Mäusen vermittelte [139]. Somit bleibt zum Verständnis der IL-35 Regulation ein immenser Forschungsbedarf.

5.3 Klinische Relevanz von regulatorischen Zytokinen bei Multipler Sklerose

Neueste Beobachtungen aus Tiermodellen verschiedener Autoimmunkrankheiten, einschließlich experimenteller Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE) zeigen, dass eine Manipulation regulatorischer B-Zell-Zytokine die Schwere der Erkrankung beeinflussen kann [36]. In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob Defekte bei der Regulierung humaner B-Zell-Zytokine im Rahmen der MS involviert sind. Es wurde bereits gezeigt, dass bei MS-Patienten die IL-10 Sekretion der B-Zellen signifikant vermindert ist. Dieses Phänomen ist vornehmlich bei SP-MS und RR-MS im Vergleich zu gesunden Probanden zu sehen [140]. IL-35 als weiteres regulatorisches Zytokin wurde in dieser Arbeit im gleichen Rahmen untersucht. In Anlehnung der bereits für IL-10 gezeigten Ergebnisse kann ebenfalls ein signifikant erniedrigter IL-35-Spiegel im Blut bei SP-MS Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen gemessen werden.

Ob Bregs jedoch als alleiniger Regulator der IL-35 oder IL-10 Produktion dient, muss jedoch vor dem Hintergrund der Rolle der Tregs kritisch beobachtet werden. Jafarzedeh et al konnte 2015 zeigen, dass verschiedene genetische Polymorphismen im Foxp3-Transkriptionsfaktor zu geringeren IL-35 Serumwerten von MS-Patienten führen [141]. Dementsprechend muss an dieser Stelle verdeutlicht werden, dass die regulatorischen Zytokine IL-10 und IL-35 durch verschiedene Produzenten gesteuert werden.

5.3.1 Fingolimod

Obwohl für B-Zellen ein signifikanter Abfall der Zellzahlen unter Fingolimod Therapie im peripheren Blut beschrieben wurde, sind die Konsequenzen der Behandlung mit Fingolimod auf B-Zell-Untergruppen nicht geklärt. Bereits bekannt ist der Effekt von Fingolimod regulatorische und inflammatorische Inbalancen auszugleichen [142]. Es wurde gezeigt, dass sich B-Zell-Untergruppen im peripheren Blut zu Gunsten der regulatorischen B-Zellen verschieben, insbesondere der transitionalen CD24⁺CD38⁺ B Zellen, welches unter anderen auf eine verminderte Expression von Lymphknoten-Homing-Molekülen (L-Selektin, CCR7, LFA-1) der Bregs zurückzuführen ist [142]. In Zusammenschau mit unseren Ergebnissen wird dieser periphere Anstieg der Breg-Zellzahl zum Teil durch eine direkte Stimulation der B-Zellen unter Fingolimod verursacht. In unserer Arbeit konnte bestätigt werden, dass unter Fingolimod B10-Zellen prozentual ansteigen. In den Messversuchen mittels ELISA wurde keine signifikante Änderung der IL-10 und IL-35 Produktionsmenge bei in vitro Fingolimod-

Stimulation von B-Zellen gefunden. Ebenso war keine einheitliche IL-10 sowie IL-35 Änderung in venösen Plasmaproben von Fingolimod behandelten MS-Patienten vor und während der Therapie beobachtet worden. Die Ursache für die fehlende Nachweisbarkeit eines Effekts liegen womöglich in der systemisch-venösen Messung von IL-10 und IL-35, wo andere zelluläre Produzenten von IL-10 und IL-35 im Blut einen Einfluss auf die Messwerte haben. Eine *ex vivo* Stimulierung und Messung regulatorischer Zytokine von isolierten Bregs Fingolimod-behandelter MS-Patienten kann Klarheit in diesem Aspekt verschaffen. Im Weiteren wurde gezeigt, dass eine Erhöhung der Bregs im peripheren Blut durch Fingolimod auf ein gutes Ansprechen auf die Behandlung hinweisen kann. Bei MS erwiesen die Patienten, die die Kriterien einer stabilen Erkrankung erfüllten, einen signifikant höheren Prozentsatz regulatorischer B-Zellen auf als Patienten mit aktiver Erkrankung [142]. Dementsprechend kann ein fehlendes Ansprechen auf Fingolimod zu einer verminderten regulatorischen Antwort führen und die Plasmawerte von IL-35 und IL-10 ebenso beeinflussen. Die Individualität der Fingolimod Behandlung eines MS Patienten wirft somit unberechenbare Faktoren auf die messbaren Zytokine auf. Vor dem Hintergrund, dass in dieser Arbeit eine signifikante Korrelation des IL-35 Plasma-Wertes zum EDSS gezeigt werden konnte, kann zukünftig eine Aufteilung der Patienten in „Therapieresistenz“ und „Therapieerfolg“ als EDSS-Verlaufswert bei Messen der Werte von Fingolimod therapierten MS-Patienten berücksichtigt werden. Die Arbeit von Blumenfeld 2016 untersuchte auf ähnlicher Weise regulatorische B-Zellen unter Behandlung von Fingolimod isoliert bei RR-MS-Patienten. Es konnte gezeigt werden, dass unter dreimonatiger Fingolimod-Behandlung die Verteilung der B-Zellen im peripheren Blut zugunsten der regulatorischen B-Zellen (v.a. Plasmazellen, transitionale B-Zellen) verschoben werden konnte [143]. Interessanterweise konnte *in vivo* gezeigt werden, dass unter dieser Therapie eine signifikante prozentuale Steigung von CD38+, CD24+ und CD138+ B-Zellen gegeben ist. Ob nun dieser Effekt von Fingolimod auf eine gesteigerte B-Zelldifferenzierung oder auf einer Umverteilung der B-Zell-Untergruppen im peripheren Blut zurückzuführen ist, bleibt trotzdem unbekannt. Weiterhin ist mit der Erkenntnis, dass regulatorische B Zellen ins ZNS-Gewebe über die Blut-Hirnschranke bevorzugt migrieren [142], eine CSF Messung von IL-35 nach Fingolimod Therapie von wissenschaftlichen Interesse. In unseren Experimenten konnte jedoch IL-35 im CSF nahezu nicht nachgewiesen werden. Die Untersuchung von IL-35 Die Untersuchung von IL-35 durch sensitivere Nachweismethoden wie Massenspektrometrie wäre daher zu diskutieren. Zusammenfassend kann aktuell von IL-35 als universeller Marker im Blut für ein Therapieansprechen von Fingolimod nicht eindeutig ausgegangen werden.

5.3.2 Rituximab

Als weiteres MS-Medikament übt Rituximab seine Wirkung durch B-Zell-Eliminierung und anschließende B-Zell-Repopulation aus, die durch das Überwiegen von CD24⁺CD38⁺ Bregs und damit IL-10⁺ B-Zellen charakterisiert wurde [144]. Eine absolute IL-10- und IL-35-Plasmawerterhöhung konnte in unseren Messungen nach Rituximab Therapie nicht beobachtet werden. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, sind die Effekte von Rituximab bei Behandlung von Patienten auch mit proinflammatorischen Auswirkungen und damit Verschlechterung des Krankheitsausmaßes charakterisiert, die eine Eliminierung regulatorischer B-Zellen nicht ausschließen kann. Brod et al hatte 2016 ein Experiment mit Rituximab behandelten EAE-Mäusen durchgeführt und zeigte eine Abnahme der entzündlichen Zytokine TNF- α , IFN- γ , p70 und des IL-17 in der Milz und im ZNS ohne eine Zunahme von IL-10 gemessen zu haben [145]. Jedoch konnte insgesamt bei Rituximab behandelten EAE-Mäusen eine Supprimierung der Erkrankung erzielt werden. Interessanterweise hängt die Rolle der B-Zellen während der EAE-Immunpathogenese zusätzlich vom Zeitpunkt der Beteiligung von B-Zellen im Krankheitsverlauf ab [146]. Brod zeigte auf dieser Basis, dass eine Inaktivierung von B-Zellen während des Fortschreitens der EAE (14 Tage nach der Inokulation) die Krankheit dramatisch hemmt. Wie auch bei Fingolimod erwähnt, ist hier die Messung von regulatorischen Zytokinen bei MS-Patienten ein außerordentlich vielschichtiges und von zahlreichen Einflussfaktoren abhängiges Unterfangen. Als universelle Marker der Krankheitsaktivität für Rituximab behandelte MS-Patienten sind IL-10 und IL-35 somit weiterhin nicht anzusehen.

6 Zusammenfassung

Die jüngste Entdeckung einer IL-35 kompetenten B-Zell-Untergruppe bei Mäusen erweitert das Repertoire regulatorischer B-Zellen (Bregs) und führt zu wissenschaftlichen Interessen, die sich mit ihrer Regulation und Entstehung beschäftigen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass humane B-Zellen in der Lage sind IL-35 zu produzieren und somit eine „B35“-Zell-Untergruppe rechtfertigen. Zur Entstehung von B35-Zellen finden sich unter den optimalen Stimulationsreagenzien Toll-Like-Rezeptor-Liganden 7, 8 und 9 jeweils in Ko-Kultur mit dem CD40-Liganden. Die ideale Stimulationsdauer beträgt zwischen zwei bis vier Tage. Zur weiteren Charakterisierung humaner B35-Zellen wurden Untersuchungen zum Phänotyp durchgeführt. Jedoch stellte sich kein einheitliches Oberflächenmarkerprofil heraus: B-Zellen zeigen im Laufe der Entwicklung als transitionale B-Zellen (CD24+CD38+), Gedächtnis B-Zellen (CD24+CD27+) und Plasmablasten (CD38+CD27+) die ständige Fähigkeit regulatorisches IL-35 zu produzieren. Letztlich lässt sich der höchste Anteil an B35-Zellen in den Plasmablasten und Plasmazellen finden. Ein Vergleich mit IL-10 produzierenden B-Zellen (B10-Zellen) zeigt ähnliche Verhältnisse der Oberflächenmarker-Expression mit Dominanz in Gedächtnis-B-Zellen und Plasmablasten. Die daraus folgende Frage, ob eine Schnittmenge zwischen den Phänotypen der B10 und B35-Zellen vorhanden ist, wurde in einem weiteren Versuch untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der B10-Zellen IL-35-kompetent sind und umgekehrt B35-Zellen auch IL-10 produzieren können. In Hinblick auf aktuelle medikamentöse MS-Therapien wurde *in vitro* festgestellt, dass Fingolimod die B10-Zellzahl signifikant erhöht. Ein Anstieg der absoluten Produktionsmenge von IL-10 und IL-35 unter Fingolimod, im Sinne eines direkten B-Zellsimulators, konnte jedoch *in vitro* nicht gezeigt werden. Die klinische Relevanz von IL-35 bestätigte sich in einer weiteren Untersuchung in Plasmaproben von MS-Patienten. Plasmawerte von Patienten mit sekundär progredienter MS zeigen signifikant niedrigere IL-35-Werte als Kontrollpersonen. Ebenso besteht eine signifikant umgekehrte Korrelation der Krankheitsaktivität, gemessen als EDSS-Score (*Expanded Disability Status Scale*), zum IL-35 Plasmawert. Um IL-35 als definitiven Marker für ein Therapieansprechen unter Behandlung mit Fingolimod und Rituximab zu überprüfen, wurde eine zeitliche Verlaufsmessung durchgeführt, in der jedoch keine erkennbare Wechselbeziehung beobachtet wurde. IL-35 behauptet sich in der vorliegenden Arbeit als eine wichtige Rolle in der Immunpathophysiologie autoimmuner Erkrankung insbesondere der MS. Zukünftige Studien stehen aus, ob B10- und B35-Zellen neue Möglichkeiten für pharmakologische Interventionen bieten können.

7 Literaturverzeichnis

1. Parkin, J. and B. Cohen, An overview of the immune system. *Lancet*, 2001. 357(9270): p. 1777-89.
2. Yuseff, M.I., et al., How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity. *Nat Rev Immunol*, 2013. 13(7): p. 475-86.
3. Engel, P., et al., CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology. *J Immunol*, 2015. 195(10): p. 4555-63.
4. Pieper, K., B. Grimbacher, and H. Eibel, B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol*, 2013. 131(4): p. 959-71.
5. Tedder, T.F., CD19: a promising B cell target for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 2009. 5(10): p. 572-7.
6. Palanichamy, A., et al., Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy. *J Immunol*, 2009. 182(10): p. 5982-93.
7. Vences-Catalan, F. and L. Santos-Argumedo, CD38 through the life of a murine B lymphocyte. *IUBMB Life*, 2011. 63(10): p. 840-6.
8. Oracki, S.A., et al., Plasma cell development and survival. *Immunol Rev*, 2010. 237(1): p. 140-59.
9. Zha, B., et al., Decrease in proportion of CD19⁺ CD24(hi) CD27⁺ B cells and impairment of their suppressive function in Graves' disease. *PLoS One*, 2012. 7(11): p. e49835.
10. Lanzavecchia, A., Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature*, 1985. 314(6011): p. 537-9.
11. Villadangos, J.A. and H.L. Ploegh, Proteolysis in MHC class II antigen presentation: who's in charge? *Immunity*, 2000. 12(3): p. 233-9.
12. Batista, F.D., D. Iber, and M.S. Neuberger, B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature*, 2001. 411(6836): p. 489-94.
13. Fecteau, J.F. and S. Neron, CD40 stimulation of human peripheral B lymphocytes: distinct response from naive and memory cells. *J Immunol*, 2003. 171(9): p. 4621-9.
14. Muraguchi, A., et al., Interleukin 2 receptors on human B cells. Implications for the role of interleukin 2 in human B cell function. *J Exp Med*, 1985. 161(1): p. 181-97.
15. Ding, B.B., et al., IL-21 and CD40L synergistically promote plasma cell differentiation through upregulation of Blimp-1 in human B cells. *J Immunol*, 2013. 190(4): p. 1827-36.

16. Jimenez-Dalmaroni, M.J., M.E. Gerswhin, and I.E. Adamopoulos, The critical role of toll-like receptors--From microbial recognition to autoimmunity: A comprehensive review. *Autoimmun Rev*, 2016. 15(1): p. 1-8.
17. Bell, J.K., et al., Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol*, 2003. 24(10): p. 528-33.
18. Akira, S., TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006. 311: p. 1-16.
19. Pandey, S., T. Kawai, and S. Akira, Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014. 7(1): p. a016246.
20. Martin, F., A.M. Oliver, and J.F. Kearney, Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity*, 2001. 14(5): p. 617-29.
21. Balazs, M., et al., Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity*, 2002. 17(3): p. 341-52.
22. Ozinsky, A., et al., The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(25): p. 13766-71.
23. Jimenez-Dalmaroni, M.J., et al., Soluble human TLR2 ectodomain binds diacylglycerol from microbial lipopeptides and glycolipids. *Innate Immun*, 2015. 21(2): p. 175-93.
24. Underhill, D.M., et al., Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(25): p. 14459-63.
25. Park, B.S., et al., The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*, 2009. 458(7242): p. 1191-5.
26. Hayashi, F., et al., The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 2001. 410(6832): p. 1099-103.
27. Stanislawowski, M., et al., Decreased Toll-like receptor-5 (TLR-5) expression in the mucosa of ulcerative colitis patients. *J Physiol Pharmacol*, 2009. 60 Suppl 4: p. 71-5.
28. Chattopadhyay, S. and G.C. Sen, dsRNA-activation of TLR3 and RLR signaling: gene induction-dependent and independent effects. *J Interferon Cytokine Res*, 2014. 34(6): p. 427-36.
29. Hemmi, H., et al., A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 2000. 408(6813): p. 740-5.

30. Heil, F., et al., Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*, 2004. 303(5663): p. 1526-9.
31. Jiang, S., et al., TLR10 Is a Negative Regulator of Both MyD88-Dependent and -Independent TLR Signaling. *J Immunol*, 2016. 196(9): p. 3834-41.
32. Medzhitov, R., Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 2008. 454(7203): p. 428-35.
33. Nathan, C. and A. Ding, Nonresolving inflammation. *Cell*, 2010. 140(6): p. 871-82.
34. Mauri, C. and A. Bosma, Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol*, 2012. 30: p. 221-41.
35. Wolf, S.D., et al., Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J Exp Med*, 1996. 184(6): p. 2271-8.
36. Fillatreau, S., et al., B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol*, 2002. 3(10): p. 944-50.
37. Flores-Borja, F., et al., CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci Transl Med*, 2013. 5(173): p. 173ra23.
38. Carter, N.A., et al., Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *J Immunol*, 2011. 186(10): p. 5569-79.
39. Blair, P.A., et al., CD19(+)/CD24(hi)/CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity*, 2010. 32(1): p. 129-40.
40. Iwata, Y., et al., Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*, 2011. 117(2): p. 530-41.
41. Evans, J.G., et al., Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J Immunol*, 2007. 178(12): p. 7868-78.
42. Rosser, E.C., P.A. Blair, and C. Mauri, Cellular targets of regulatory B cell-mediated suppression. *Mol Immunol*, 2014. 62(2): p. 296-304.
43. Yanaba, K., et al., A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity*, 2008. 28(5): p. 639-50.
44. Yoshizaki, A., et al., Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature*, 2012. 491(7423): p. 264-8.
45. Gray, M., et al., Apoptotic cells protect mice from autoimmune inflammation by the induction of regulatory B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(35): p. 14080-5.

46. Neves, P., et al., Signaling via the MyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during *Salmonella typhimurium* infection. *Immunity*, 2010. 33(5): p. 777-90.
47. Shen, P., et al., IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature*, 2014. 507(7492): p. 366-370.
48. Matsumoto, M., et al., Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity*, 2014. 41(6): p. 1040-51.
49. van de Veen, W., et al., IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *J Allergy Clin Immunol*, 2013. 131(4): p. 1204-12.
50. Collison, L.W. and D.A. Vignali, Interleukin-35: odd one out or part of the family? *Immunol Rev*, 2008. 226: p. 248-62.
51. Vignali, D.A. and V.K. Kuchroo, IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol*, 2012. 13(8): p. 722-8.
52. Yoshida, K., et al., Deletion of interleukin-12p40 suppresses autoimmune cholangitis in dominant negative transforming growth factor beta receptor type II mice. *Hepatology*, 2009. 50(5): p. 1494-500.
53. Langrish, C.L., et al., IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*, 2004. 202: p. 96-105.
54. Kastelein, R.A., C.A. Hunter, and D.J. Cua, Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu Rev Immunol*, 2007. 25: p. 221-42.
55. Collison, L.W., et al., The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 2007. 450(7169): p. 566-9.
56. Wirtz, S., et al., EBV-induced gene 3 transcription is induced by TLR signaling in primary dendritic cells via NF-kappa B activation. *J Immunol*, 2005. 174(5): p. 2814-24.
57. Goriely, S., et al., Interferon regulatory factor 3 is involved in Toll-like receptor 4 (TLR4)- and TLR3-induced IL-12p35 gene activation. *Blood*, 2006. 107(3): p. 1078-84.
58. Tedder, T.F. and W.J. Leonard, Autoimmunity: regulatory B cells--IL-35 and IL-21 regulate the regulators. *Nat Rev Rheumatol*, 2014. 10(8): p. 452-3.
59. Terayama, H., et al., Contribution of IL-12/IL-35 common subunit p35 to maintaining the testicular immune privilege. *PLoS One*, 2014. 9(4): p. e96120.

60. Banchereau, J., V. Pascual, and A. O'Garra, From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines. *Nat Immunol*, 2012. 13(10): p. 925-31.
61. Collison, L.W., et al., IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat Immunol*, 2010. 11(12): p. 1093-101.
62. Collison, L.W., et al., The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional. *Nat Immunol*, 2012. 13(3): p. 290-9.
63. Wang, R.X., et al., Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nat Med*, 2014. 20(6): p. 633-41.
64. Trapp, B.D., et al., Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 1998. 338(5): p. 278-85.
65. Compston, A. and A. Coles, Multiple sclerosis. *Lancet*, 2008. 372(9648): p. 1502-17.
66. Dendrou, C.A., L. Fugger, and M.A. Friese, Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*, 2015. 15(9): p. 545-58.
67. Jersild, C., A. Svejgaard, and T. Fog, HL-A antigens and multiple sclerosis. *Lancet*, 1972. 1(7762): p. 1240-1.
68. International Multiple Sclerosis Genetics, C., et al., Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet*, 2013. 45(11): p. 1353-60.
69. Wingerchuk, D.M., Environmental factors in multiple sclerosis: Epstein-Barr virus, vitamin D, and cigarette smoking. *Mt Sinai J Med*, 2011. 78(2): p. 221-30.
70. Berer, K., et al., Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature*, 2011. 479(7374): p. 538-41.
71. Wu, C., et al., Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature*, 2013. 496(7446): p. 513-7.
72. Olson, J.K., et al., A virus-induced molecular mimicry model of multiple sclerosis. *J Clin Invest*, 2001. 108(2): p. 311-8.
73. Ji, Q., A. Perchet, and J.M. Goverman, Viral infection triggers central nervous system autoimmunity via activation of CD8+ T cells expressing dual TCRs. *Nat Immunol*, 2010. 11(7): p. 628-34.
74. Ransohoff, R.M. and B. Engelhardt, The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat Rev Immunol*, 2012. 12(9): p. 623-35.
75. Heneka, M.T., M.P. Kummer, and E. Latz, Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol*, 2014. 14(7): p. 463-77.

76. Stangel, M., et al., The utility of cerebrospinal fluid analysis in patients with multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*, 2013. 9(5): p. 267-76.
77. Obermeier, B., et al., Related B cell clones that populate the CSF and CNS of patients with multiple sclerosis produce CSF immunoglobulin. *J Neuroimmunol*, 2011. 233(1-2): p. 245-8.
78. Lovato, L., et al., Related B cell clones populate the meninges and parenchyma of patients with multiple sclerosis. *Brain*, 2011. 134(Pt 2): p. 534-41.
79. Owens, G.P., et al., Single-cell repertoire analysis demonstrates that clonal expansion is a prominent feature of the B cell response in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *J Immunol*, 2003. 171(5): p. 2725-33.
80. Obermeier, B., et al., Matching of oligoclonal immunoglobulin transcriptomes and proteomes of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Nat Med*, 2008. 14(6): p. 688-93.
81. Jarius, S., et al., The intrathecal, polyspecific antiviral immune response: Specific for MS or a general marker of CNS autoimmunity? *J Neurol Sci*, 2009. 280(1-2): p. 98-100.
82. Serafini, B., et al., Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol*, 2004. 14(2): p. 164-74.
83. Krumbholz, M., et al., B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurol*, 2012. 8(11): p. 613-23.
84. Krumbholz, M., et al., BAFF is elevated in serum of patients with Wegener's granulomatosis. *J Autoimmun*, 2005. 25(4): p. 298-302.
85. Krumbholz, M., et al., Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. *Brain*, 2006. 129(Pt 1): p. 200-11.
86. Keegan, M., et al., Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange. *Lancet*, 2005. 366(9485): p. 579-82.
87. von Budingen, H.C., et al., B cell exchange across the blood-brain barrier in multiple sclerosis. *J Clin Invest*, 2012. 122(12): p. 4533-43.
88. Mayer, M.C., et al., Distinction and temporal stability of conformational epitopes on myelin oligodendrocyte glycoprotein recognized by patients with different inflammatory central nervous system diseases. *J Immunol*, 2013. 191(7): p. 3594-604.

89. Mathey, E.K., et al., Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *J Exp Med*, 2007. 204(10): p. 2363-72.
90. Srivastava, R., et al., Potassium channel KIR4.1 as an immune target in multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 2012. 367(2): p. 115-23.
91. Kanter, J.L., et al., Lipid microarrays identify key mediators of autoimmune brain inflammation. *Nat Med*, 2006. 12(1): p. 138-43.
92. Hauser, S.L., et al., B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 2008. 358(7): p. 676-88.
93. Martin, F. and A.C. Chan, B cell immunobiology in disease: evolving concepts from the clinic. *Annu Rev Immunol*, 2006. 24: p. 467-96.
94. Cornec, D., et al., Critical analysis of rituximab-induced serological changes in connective tissue diseases. *Autoimmun Rev*, 2009. 8(6): p. 515-9.
95. Cambridge, G., et al., B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus: effect on autoantibody and antimicrobial antibody profiles. *Arthritis Rheum*, 2006. 54(11): p. 3612-22.
96. Pellkofer, H.L., et al., Long-term follow-up of patients with neuromyelitis optica after repeated therapy with rituximab. *Neurology*, 2011. 76(15): p. 1310-5.
97. Castillo-Trivino, T., et al., Rituximab in relapsing and progressive forms of multiple sclerosis: a systematic review. *PLoS One*, 2013. 8(7): p. e66308.
98. Bar-Or, A., et al., Rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a 72-week, open-label, phase I trial. *Ann Neurol*, 2008. 63(3): p. 395-400.
99. Weber, M.S., et al., B-cell activation influences T-cell polarization and outcome of anti-CD20 B-cell depletion in central nervous system autoimmunity. *Ann Neurol*, 2010. 68(3): p. 369-83.
100. Fleischmann, R.M., Progressive multifocal leukoencephalopathy following rituximab treatment in a patient with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2009. 60(11): p. 3225-8.
101. Salzer, J., et al., Rituximab in multiple sclerosis: A retrospective observational study on safety and efficacy. *Neurology*, 2016. 87(20): p. 2074-2081.
102. Juanatey, A., L. Blanco-Garcia, and N. Tellez, Ocrelizumab: its efficacy and safety in multiple sclerosis. *Rev Neurol*, 2018. 66(12): p. 423-433.
103. Venkataraman, K., et al., Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate. *Circ Res*, 2008. 102(6): p. 669-76.

104. Yatomi, Y., et al., Sphingosine 1-phosphate as a major bioactive lysophospholipid that is released from platelets and interacts with endothelial cells. *Blood*, 2000. 96(10): p. 3431-8.
105. Hanel, P., P. Andreani, and M.H. Graler, Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. *FASEB J*, 2007. 21(4): p. 1202-9.
106. Spiegel, S. and S. Milstien, Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. 4(5): p. 397-407.
107. Takabe, K., et al., "Inside-out" signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. *Pharmacol Rev*, 2008. 60(2): p. 181-95.
108. Dev, K.K., et al., Brain sphingosine-1-phosphate receptors: implication for FTY720 in the treatment of multiple sclerosis. *Pharmacol Ther*, 2008. 117(1): p. 77-93.
109. Schwab, S.R. and J.G. Cyster, Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nat Immunol*, 2007. 8(12): p. 1295-301.
110. Brinkmann, V., et al., The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J Biol Chem*, 2002. 277(24): p. 21453-7.
111. Mandala, S., et al., Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science*, 2002. 296(5566): p. 346-9.
112. Mullershausen, F., et al., Persistent signaling induced by FTY720-phosphate is mediated by internalized S1P1 receptors. *Nat Chem Biol*, 2009. 5(6): p. 428-34.
113. Matloubian, M., et al., Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature*, 2004. 427(6972): p. 355-60.
114. Schwab, S.R., et al., Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science*, 2005. 309(5741): p. 1735-9.
115. Hohlfeld, R., F. Barkhof, and C. Polman, Future clinical challenges in multiple sclerosis: Relevance to sphingosine 1-phosphate receptor modulator therapy. *Neurology*, 2011. 76(8 Suppl 3): p. S28-37.
116. Aktas, O., et al., Fingolimod is a potential novel therapy for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*, 2010. 6(7): p. 373-82.
117. Cinamon, G., et al., Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone. *Nat Immunol*, 2004. 5(7): p. 713-20.
118. Pereira, J.P., Y. Xu, and J.G. Cyster, A role for S1P and S1P1 in immature-B cell egress from mouse bone marrow. *PLoS One*, 2010. 5(2): p. e9277.
119. Kowarik, M.C., et al., Differential effects of fingolimod (FTY720) on immune cells in the CSF and blood of patients with MS. *Neurology*, 2011. 76(14): p. 1214-21.

120. Sinha, R.K., et al., B lymphocytes exit lymph nodes through cortical lymphatic sinusoids by a mechanism independent of sphingosine-1-phosphate-mediated chemotaxis. *Immunity*, 2009. 30(3): p. 434-46.
121. Cinamon, G., et al., Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nat Immunol*, 2008. 9(1): p. 54-62.
122. Han, S., et al., FTY720 suppresses humoral immunity by inhibiting germinal center reaction. *Blood*, 2004. 104(13): p. 4129-33.
123. Foster, C.A., et al., Brain penetration of the oral immunomodulatory drug FTY720 and its phosphorylation in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis: consequences for mode of action in multiple sclerosis. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007. 323(2): p. 469-75.
124. Miron, V.E., et al., FTY720 modulates human oligodendrocyte progenitor process extension and survival. *Ann Neurol*, 2008. 63(1): p. 61-71.
125. Miron, V.E., et al., Cyclical and dose-dependent responses of adult human mature oligodendrocytes to fingolimod. *Am J Pathol*, 2008. 173(4): p. 1143-52.
126. Jung, C.G., et al., Functional consequences of S1P receptor modulation in rat oligodendroglial lineage cells. *Glia*, 2007. 55(16): p. 1656-67.
127. Coelho, R.P., et al., The immunomodulator FTY720 has a direct cytoprotective effect in oligodendrocyte progenitors. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007. 323(2): p. 626-35.
128. Khatri, B., et al., Comparison of fingolimod with interferon beta-1a in relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised extension of the TRANSFORMS study. *Lancet Neurol*, 2011. 10(6): p. 520-9.
129. Cohen, J.A., et al., Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 2010. 362(5): p. 402-15.
130. Kappos, L., et al., A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 2010. 362(5): p. 387-401.
131. Rosser, E.C., et al., Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1beta and interleukin-6 production. *Nat Med*, 2014. 20(11): p. 1334-9.
132. Yoshida, H. and Y. Miyazaki, Regulation of immune responses by interleukin-27. *Immunol Rev*, 2008. 226: p. 234-47.
133. Pflanz, S., et al., IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4+ T cells. *Immunity*, 2002. 16(6): p. 779-90.
134. Vasconcellos, R., et al., IL-12p35 subunit contributes to autoimmunity by limiting IL-27-driven regulatory responses. *J Immunol*, 2011. 187(6): p. 3402-12.

135. Brahmachari, S. and K. Pahan, Role of cytokine p40 family in multiple sclerosis. *Minerva Med*, 2008. 99(2): p. 105-18.
136. Jones, L.L., et al., Distinct subunit pairing criteria within the heterodimeric IL-12 cytokine family. *Mol Immunol*, 2012. 51(2): p. 234-44.
137. Dambuza, I.M., et al., IL-12p35 induces expansion of IL-10 and IL-35-expressing regulatory B cells and ameliorates autoimmune disease. *Nat Commun*, 2017. 8(1): p. 719.
138. Choi, J.K., et al., IL-12p35 Inhibits Neuroinflammation and Ameliorates Autoimmune Encephalomyelitis. *Front Immunol*, 2017. 8: p. 1258.
139. Wang, X., et al., A novel IL-23p19/Ebi3 (IL-39) cytokine mediates inflammation in Lupus-like mice. *Eur J Immunol*, 2016. 46(6): p. 1343-50.
140. Duddy, M., et al., Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J Immunol*, 2007. 178(10): p. 6092-9.
141. Jafarzadeh, A., et al., Circulating levels of interleukin-35 in patients with multiple sclerosis: evaluation of the influences of FOXP3 gene polymorphism and treatment program. *J Mol Neurosci*, 2015. 55(4): p. 891-7.
142. Grutzke, B., et al., Fingolimod treatment promotes regulatory phenotype and function of B cells. *Ann Clin Transl Neurol*, 2015. 2(2): p. 119-30.
143. Blumenfeld, S., E. Staun-Ram, and A. Miller, Fingolimod therapy modulates circulating B cell composition, increases B regulatory subsets and production of IL-10 and TGFbeta in patients with Multiple Sclerosis. *J Autoimmun*, 2016. 70: p. 40-51.
144. Quan, C., et al., The immune balance between memory and regulatory B cells in NMO and the changes of the balance after methylprednisolone or rituximab therapy. *J Neuroimmunol*, 2015. 282: p. 45-53.
145. Brod, S.A., Ingested (oral) rituximab inhibits EAE. *Cytokine*, 2016. 85: p. 177-83.
146. Matsushita, T., et al., Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J Clin Invest*, 2008. 118(10): p. 3420-30.

8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Edgar Meinl für die Möglichkeit der Bearbeitung des Projekts bedanken. Seine Sachkunde und Anregungen waren essenziell für das Gelingen dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt an meine Betreuerin Dr. Franziska Thaler, die mir im gesamten Verlauf dieser Forschungsarbeit erfahren und in stetiger Bereitschaft zur Seite stand. Die Planung sowie der Erfolg der Versuche wären ohne sie nicht möglich gewesen.

Ebenso bedanke ich mich bei meinen Labormitarbeiter Heike Rübsamen, Kerstin Berer, Ramona Gerhards, Sarah Laurent, Melania Spadaro und Elisabeth Schuh, die mich in die verschiedensten Methoden eingeführt haben und zu jeder Zeit fachkundige Ratschläge und zum Fortschritt der Versuche geleistet haben.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir in allen Phasen des Studiums unterstützt hatten und mir eine unbeschwerte Zeit der Ausbildung ermöglichten.