

**Einfluss von Immunsuppressiva auf die Expression und  
Freisetzung des B-Zell-aktivierenden Faktors der  
Tumornekrosefamilie (BAFF)  
in der monozytären Zelllinie U-937**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Elisabeth Regina Jank  
aus Braunschweig

Gießen 2017

Aus dem Zentrum für Neurologie und Neurochirurgie  
Klinik für Neurologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Leiter: Prof. Dr. med. M. Kaps

1. Gutachter: Prof. Dr. F. Blaes

2. Gutachter: Prof. Dr. G. Bein

Tag der Disputation: 12.06.2018

In liebevoller Erinnerung und Dankbarkeit  
an Angela Köhler-Jank

# Inhaltverzeichnis:

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 <i>Das Immunsystem</i> .....	1
1.1.1 Angeborene und erworbene Immunität .....	1
1.1.2 Autoimmunität .....	2
1.1.3 Transplantationsimmunologie .....	3
1.2 <i>BAFF - B-Zell aktivierender Faktor der TNF-Familie</i> .....	5
1.2.1 Struktur, Expression und Regulation von BAFF .....	5
1.2.2 Rezeptoren von BAFF und physiologische Wirkung .....	6
1.2.3 Die Assoziation von BAFF mit Autoimmunerkrankungen und Transplantation .....	9
1.3 <i>Vorstellung der verwendeten Immunsuppressiva</i> .....	11
1.3.1 Rapamycin, - ein m-TOR (mammalian target of rapamycin) -Antagonist .....	12
1.3.2 Cyclosporin A- ein Calcineurininhibitor .....	12
1.3.3 Mycophenolatmofetil – ein Antimetabolit .....	14
1.3.4 Methotrexat - ein Folsäureantagonist .....	14
1.3.5 Valproinsäure - ein Immunmodulator .....	15
1.4 <i>Fragestellung</i> .....	16
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
2.1 <i>Material</i> .....	17
2.1.1 Chemikalien, gebrauchsfertige Lösungen und Kit .....	17
2.1.2 Verbrauchsmaterial .....	18
2.1.3 Geräte .....	18
2.1.4 Puffer, Lösungen und Medien .....	19
2.1.5 Antikörper .....	19
2.1.6 Software .....	20
2.2 <i>Methoden</i> .....	21
2.2.1 Zellkultur .....	21
2.2.2 WST-1 Assay .....	24
2.2.3 Durchflusszytometrie (FACS) .....	25
2.2.4 Enzymgekoppeltes Immunoabsorptionsassay (ELISA) .....	29
2.2.5 Statistik .....	30
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>31</b>
3.1 <i>Wirkung von Immunsuppressiva auf die Viabilität von Monozyten</i> .....	31

<i>3.2 Einfluss von Immunsuppressiva auf die intrazelluläre Expression des B-Zell aktivierenden Faktor (BAFF) in Monozyten</i> .....	32
3.2.1 Rapamycin reguliert die Expression von intrazellulärem BAFF in Monozyten herunter .....	32
3.2.2 Cyclosporin A führt zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der intrazellulären BAFF-Expression in Monozyten .....	34
3.2.3 Methotrexat bewirkt einen Anstieg der intrazellulären BAFF-Expression .....	35
3.2.4 Valproinsäure hat keinen signifikanten Effekt auf die intrazelluläre BAFF-Expression in Monozyten.....	36
3.2.5 Mycophenolatmofetil hat keinen Einfluss auf die Expression von intrazellulärem BAFF in Monozyten.....	37
3.2.6 Übersicht über die Ergebnisse der Experimente zur Wirkung von Immunsuppressiva auf die intrazelluläre BAFF-Expression .....	38
<i>3.3 Einfluss von Immunsuppressiva auf die Expression des membrangebundenen B-Zell aktivierenden Faktors (BAFF) in Monozyten</i> .....	39
3.3.1 Rapamycin reguliert die Expression von membranständigem BAFF in Monozyten herunter.....	40
3.3.2 Cyclosporin A führt zu einer konzentrationsabhängigen Herunterregulierung der membranständigen BAFF-Expression in Monozyten.....	41
3.3.3 Methotrexat reguliert die Expression von membranständigem BAFF in Monozyten herunter.....	42
3.3.4 Valproinsäure reguliert die Expression von membranständigem BAFF in Monozyten herunter.....	43
3.3.5 Mycophenolatmofetil hat keinen Einfluss auf die Expression von membranständigem BAFF in Monozyten.....	44
3.3.6 Übersicht über die Ergebnisse der Experimente zur Wirkung von Immunsuppressiva auf die membrangebundene BAFF-Expression .....	45
<i>3.4 Einfluss von Immunsuppressiva auf die Freisetzung des B-Zell aktivierenden Faktors (BAFF) in Monozyten</i> .....	46
3.4.1 Rapamycin verringert die BAFF-Freisetzung in Monozyten .....	47
3.4.2 Cyclosporin A führt zu einer Abnahme der BAFF-Freisetzung in Monozyten .....	48
3.4.3 Methotrexat führt zu einer Abnahme der BAFF-Freisetzung in Monozyten.....	49
3.4.4 Valproinsäure zeigt keinen Effekt auf die BAFF-Freisetzung in Monozyten .....	50
3.4.5 Die lösliche BAFF-Konzentration in Kulturüberständen von Monozyten wird durch Mycophenolatmofetil nicht beeinflusst .....	51

3.4.6 Zusammenfassung der Resultate der Versuche zur Wirkung von Immunsuppressiva auf die BAFF-Freisetzung .....	52
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>54</b>
4.1 Modulation des B-Zellaktivierenden Faktors .....	55
4.2 Wirkung von Cortison auf BAFF .....	56
4.3 Gibt es einen gemeinsamen Wirkmechanismus der verwendeten Immunsuppressiva über die Transkriptionsfaktoren NFAT und NFκB? .....	56
4.4 Verknüpfung der Ergebnisse mit der klinischen Anwendung .....	60
4.5 Methodenkritik .....	65
<b>5. Zusammenfassung/Summary .....</b>	<b>67</b>
<b>6. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>69</b>
<b>7. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>71</b>
<b>8. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>74</b>
<b>9. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>75</b>
<b>10. Anhang.....</b>	<b>87</b>
<b>11. Ehrenwörtliche Erklärung.....</b>	<b>90</b>
<b>12. Danksagung.....</b>	<b>91</b>
<b>13. Tabellarischer Lebenslauf .....</b>	<b>92</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 *Das Immunsystem*

### 1.1.1 Angeborene und erworbene Immunität

Das Immunsystem hat die Aufgabe den Körper vor schädlichen Einflüssen zu schützen. Um das Eindringen von Pathogenen zu vermeiden, besitzt der Körper chemische und physikalische Schutzmechanismen, wozu die Haut und die Epithelien von Bronchial-, Gastrointestinal- und Urogenitalsystem gehören. Sollte ein Krankheitserreger diesen Schutzschild überwinden, kommt als erste Barriere das angeborene Immunsystem zum Einsatz. Effektorzellen wie Granulozyten, Mastzellen, Monozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen detektieren unspezifisch Pathogene und eliminieren diese direkt durch Phagozytose. Unterstützt werden diese Zellen durch lösliche Komponenten wie Komplementfaktoren, Interferone und Cytokine. Die angeborene Immunität reagiert schnell, aber unspezifisch und besitzt kein Gedächtnis, so dass die Reaktionen bei einer Reinfektion nicht angepasst werden können.

Nicht immer ist es dem angeborenem Immunsystem möglich, Eindringlinge zu erkennen und zu eliminieren, weshalb ein weiterer Schutzmechanismus in Form einer effektiveren und spezifischeren Abwehr notwendig ist. Dies leistet das adaptive Immunsystem. Dieses setzt sich zusammen aus einem zellulären (B- und T-Lymphozyten) und einem humoralen Arm (Immunglobuline). Durch Ausbildung hochselektiver Rezeptoren können B- und T-Lymphozyten Fremdantigene spezifisch erkennen. In Anwesenheit von weiteren stimulierenden Signalen werden die Lymphozyten aktiviert und dadurch die gezielte Abwehr des Pathogens eingeleitet. B-Zellen proliferieren und differenzieren zu Plasmazellen, die Immunglobuline in großen Mengen produzieren können. T-Lymphozyten können nach Proliferation eine direkt zytotoxische Wirkung oder aber regulatorischen Einfluss auf den Ablauf der Immunantwort ausüben. Die adaptive Immunabwehr verfügt darüber hinaus über langlebige Gedächtniszellen, die bei einer Reinfektion schnell und effektiv zu einer Immunantwort führen (Janeway 2001; Chaplin 2006).

### 1.1.2 Autoimmunität

Eine wichtige Eigenschaft des adaptiven Immunsystems ist es körpereigene von körperfremden Antigenen zu unterscheiden. Kommt es zu einer Störung dieser grundlegenden Funktion und infolgedessen zum Angriff des Immunsystems auf gesundes Gewebe spricht man von Autoimmunität. Autoimmunität beruht vermutlich nicht auf einer einzelnen Ursache sondern ist Folge des Zusammenspiels von genetischen, externen und immunologischen Einflüssen (Ermann and Fathman 2001). Bestimmte Genpolymorphismen prädisponieren für Autoimmunerkrankungen. Menschen mit diesen Genvarianten erkranken zwar sehr viel häufiger an der jeweiligen Autoimmunerkrankung, die Entwicklung ist aber nicht zwangsläufig gegeben. So besitzt ein Großteil der Morbus Bechterew-Patienten das HLA-B27 Allel (HLA: human leucocyte antigen), jedoch ist auch ein Teil der Normalbevölkerung ohne Autoimmunerkrankungen HLA-B27 positiv (Gerber et al. 1977; Reveille 2006).

Es wurde beobachtet dass einige Autoimmunerkrankungen mit vorausgehenden Infektionen assoziiert sind. Dies führte zu der Annahme, dass Infektionen bei der Ätiologie von Autoimmunität eine wichtige Rolle inne haben (Whitton and Fujinami 1999). Dabei bezeichnet Molekulare Mimikry die Tatsache, dass Erreger Epitope besitzen die körpereigenen Antigenen stark ähneln. Da das Immunsystem aufgrund der Strukturähnlichkeit die fremden Antigene nicht von den eigenen Antigenen unterscheiden kann, kreuzreagieren aktivierte T-Zellen und führen zu einer Schädigung des körpereigenen Gewebes (Fujinami and Oldstone 1985; Oldstone 1998). Auch kann die Ausbildung von Superantigenen durch Viren oder Bakterien zur Autoimmunität beitragen. Superantigene aktivieren unspezifisch T-Zellen. Werden dabei autoreaktive T-Zellen stimuliert, kann Autoimmunität induziert werden (Conrad et al. 1994; Carreno and Collins 2002). Eine weitere Hypothese besagt, dass selbstreaktive T-Lymphozyten durch eine Immunreaktion aktiviert werden können, obwohl sie keine strukturelle Ähnlichkeit mit dem Pathogen aufweisen. Eine Infektion ruft eine spezifische Immunantwort hervor, die mit einer gesteigerten Expression von Zytokinen und Entzündungsmediatoren einhergeht. Autoreaktive T-Lymphozyten können durch dieses proinflammatorische Milieu aktiviert werden und dadurch eine Autoimmunreaktion auslösen (Wekerle et al. 1996; Carreno and Collins 2002).

Die Fähigkeit des Immunsystems körpereigene Antigene nicht anzugreifen wird als Selbsttoleranz bezeichnet. In der Entwicklung von B- und T-Lymphozyten gehen Zellen

zugrunde, die eine sehr starke Affinität zu körpereigenen Antigenen haben (negative Selektion). Der Zusammenbruch dieses Toleranzmechanismus kann ebenfalls zu der Entstehung von Autoimmunität beitragen. Im Thymus findet die T-Zellreifung statt. Antigenpräsentierende Zellen präsentieren T-Lymphozyten eine große Diversität von Autoantigenen. Gehen die T-Lymphozyten eine starke Bindung mit diesen Autoantigenen ein, werden diese T-Lymphozyten apoptotisch. Kommt es jedoch zu einer Störung in diesem Selektionsprozess und Autoantigene werden irrtümlicherweise als fremd klassifiziert, werden autoreaktive T-Lymphozyten in die Peripherie entlassen, die dann dort zu einer Autoimmunreaktion führen können (Wekerle et al. 1996). Ein ähnlicher Mechanismus findet in der Reifung der B-Zellen statt. Binden naive B-Zellen, nachdem sie aus dem Knochenmark ausgewandert sind, in der Peripherie an Autoantigene werden diese apoptotisch. Dadurch werden bis zu 80% der naiven B-Zellen bis zum Eintritt in die Milz aussortiert (Rolink et al. 1999). Kommt es zur Störung bei diesem Vorgang kann Autoimmunität entstehen.

Beruhet eine Krankheit auf Autoimmunität spricht man von einer Autoimmunerkrankung. Diese sind durch das Auftreten von Autoantikörpern oder autoreaktiven Zellen charakterisiert. Eine Übertragung von diesen Zellen und/oder Immunglobulinen auf gesunde Tiere kann zu einer Erkrankung mit ähnlichen Symptomen führen (Rose and Bona 1993).

Eine Autoimmunerkrankung kann organspezifisch oder systemisch sein. Beispiele für organspezifische Erkrankungen sind der Diabetes mellitus Typ 1 und die Hashimoto Thyreoiditis (Bach 1994; Burek and Rose 2008). Der Systemische Lupus erythematodes ist ein klassisches Beispiel für eine systemische Autoimmunerkrankung (Klinman 1989; Lin et al. 1991).

### **1.1.3 Transplantationsimmunologie**

Kommt es zu einem Funktionsverlust eines Organs ist es in vielen Fällen möglich das defekte Organ durch Transplantation eines funktionierenden Spenderorgans zu ersetzen. Meist handelt es sich dabei um eine Allotransplantation, d.h. dass zwischen zwei genetisch unterschiedlichen Individuen einer Spezies Organe übertragen werden. Ohne den Einsatz von Medikamenten kommt es dabei jedoch zu einer Immunreaktion des Empfängers auf die fremden Antigene des Spenders. Das transplantierte Organ wird dadurch so stark geschädigt, dass es seine Funktion verliert und abgestoßen wird. Ursache für die Abstoßungsreaktion sind vor allem Unterschiede in den Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC = major histocompatibility complex)

zwischen Spender und Empfänger. Dabei handelt es sich um Proteinkomplexe, die Antigenfragmente präsentieren. Diese lassen sich in zwei Kategorien unterteilen. MHC-Komplexe der Klasse eins werden von allen kernhaltigen Zellen und Thrombozyten exprimiert, MHC-Komplexe der Klasse zwei befinden sich auf professionell antigenpräsentierenden Zellen z.B. dendritische Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten. Durch Polygenie und Polymorphismus ist beim Menschen eine sehr hohe Anzahl an Proteinkombinationen möglich. Dadurch ist nahezu auszuschließen, dass genetisch nicht verwandte Personen vollständig in den MHC - Proteinen übereinstimmen. Je mehr sich die MHC-Komplexe des Spenders und Empfängers gleichen, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass das Transplantat nicht abgestoßen wird (Doxiadis et al. 1982; Sijpkens et al. 1999).

Die Abstoßung wird aufgrund der Rejektionsmechanismen im zeitlichen Verlauf in eine hyperakute, akute und chronische Form unterschieden.

Die hyperakute Abstoßung beruht auf einer Antigen/Antikörperreaktion die innerhalb von Minuten nach der Organtransplantation auftreten kann. Präformierte Antikörper die durch eine vorherige Sensibilisierung (z.B. Bluttransfusion, Schwangerschaft) entstanden sind, reagieren mit Blutgruppenantigenen oder polymorphen MHC-Komplexen des Spenders. Nach dem Beginn einer hyperakuten Abstoßungsreaktion ist eine Rettung des transplantierten Organs kaum mehr möglich. Durch die präoperativ durchgeführte Kreuzprobe kann die hyperakute Abstoßung vermieden werden.

Die akute Abstoßung beruht auf einer Reaktion von T-Zellen des Empfängers auf die als vom Empfänger als fremd erkannten MHC-Komplexe des transplantierten Organs, - es kommt zu einer Immunreaktion, die der Reaktion auf ein Fremdantigen entspricht. Nach Aktivierung von B- und T-Zellen, werden diese zu Proliferation, Differenzierung und Antikörperproduktion angeregt. Die Einwanderung der Immunzellen in das fremde Gewebe, sowie eine Entzündungsreaktion mit anschließender Abstoßung sind die Folge. Die Abstoßung kann ab dem 4. Tag nach Transplantation auftreten, ist aber auch noch nach Jahren möglich. Ein Häufigkeitsgipfel der akuten Abstoßung wird nach zwei bis drei Wochen beobachtet.

Die chronische Abstoßungsreaktion beruht auf einer zellulären und humoralen Immunreaktion und einer nichtimmunologischen Komponente, die bisher noch nicht ausreichend geklärt ist. Es kommt letztendlich zu einer Fibrose und einer Störung der Durchblutung des transplantierten Organs (Puttarajappa et al. 2012; Kissmeyer-Nielsen et al. 1966; Patel and Terasaki 1969; Colvin 2007).

## **1.2 BAFF - B-Zell aktivierender Faktor der TNF-Familie**

### **1.2.1 Struktur, Expression und Regulation von BAFF**

BAFF (B cell activating factor belonging to the TNF-family) wurde vor einigen Jahren von unterschiedlichen Forschergruppen zeitgleich beschrieben, und ist deshalb ebenso unter dem Namen BLyS (B lymphocyte stimulator), THANK (TNF Homologue That Activates Apoptosis, Nuclear Factor- $\kappa$ B and c-Jun NH2 Terminal Kinase), TALL-1 (TNF- and ApoL-related leukocyte-expressed ligand 1), zTNF4 (z-tumor necrosis factor 4) als auch TNSF 13b (TNF Superfamily Member 13b) bekannt. BAFF ist ein Mitglied der Tumornekrosefaktor (TNF) -Familie und stellt einen wichtigen Überlebensfaktor für B-Lymphozyten dar (Moore et al. 1999; Mukhopadhyay et al. 1999; Schneider et al. 1999; Shu et al. 1999; Gross et al. 2000). Die TNF-Superfamilie ist eine Gruppe von Rezeptoren und Liganden, die großen Einfluss auf die Regulation der Immunantwort und Entzündungsreaktion hat (Smith et al. 1994). Zytokine der TNF-Familie können Zellproliferation und Zelldifferenzierung, aber auch Apoptose von Zellen auslösen (Aggarwal 2003). Benannt wurde die TNF-Familie nach dem Tumornekrosefaktor, dem ersten entdeckten Ligand dieser Gruppe (Carswell et al. 1975). Alle bislang beschriebenen Liganden sind durch eine „TNF-Homologie Domäne“ (THD) gekennzeichnet. Die höchste Sequenzhomologie innerhalb der THD hat BAFF zu APRIL (a proliferation inducing ligand) (Bodmer et al. 2002). BAFF ist ein Glycoprotein das aus 284 Aminosäuren besteht. Es besitzt wie alle Zytokine der TNF-Familie eine homotrimere Struktur, das in einer membrangebundenen Form und nach Abspaltung von der Zellmembran durch eine Protease vom Furin-Typ auch in einer löslichen Form vorliegen kann (Schneider et al. 1999). Die Bildung von Oligomeren aus mehreren löslichen BAFF-Trimeren wurde ebenfalls beschrieben (Zhukovsky et al. 2004; Cachero et al. 2006). Es wird angenommen, dass die Oligomerbildung eine Signalverstärkung am Rezeptor auslöst (Bossen et al. 2008). Zudem existieren zwei Splicevarianten von BAFF:  $\Delta$ BAFF und BAFF  $\phi$ . Biologisch aktiv ist lediglich  $\Delta$ BAFF das nicht löslich sondern nur membranintegriert vorliegt und mit löslichem BAFF Heteromultimere bilden kann. Vermutet wird, dass dadurch die Freisetzung der sezernierten BAFF-Proteine reguliert wird. Im transgenen Mausmodell konnte nachgewiesen werden dass  $\Delta$ BAFF der BAFF-Überproduktion und den dadurch hervorgerufenen negativen Effekten entgegenwirkt (Gavin et al. 2003).

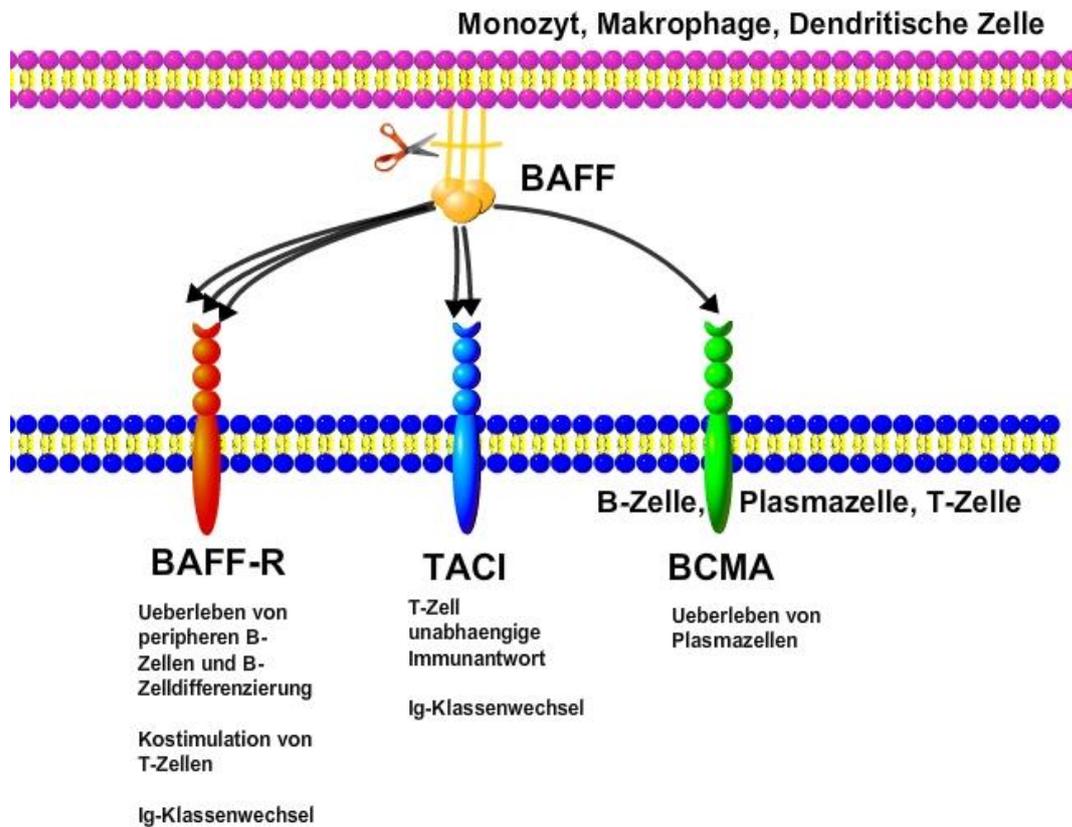
BAFF wird in peripheren lymphatischen Zellen des Blutes sowie in Milz, Knochenmark und Lymphknoten exprimiert (Moore et al. 1999; Schneider et al. 1999). Zu den BAFF-

produzierenden Zellarten zählen vor allem Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (Nardelli et al. 2001). Neutrophile Granulozyten exprimieren nach Aktivierung dieser durch Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und G-CSF (engl.: granulocyte colony-stimulating factor) hohe Mengen an löslichem BAFF (Scapini et al. 2003). Außerdem konnte die Expression von BAFF in nicht lymphoiden Zellen wie Stromazellen der Lymphknoten (Hase et al. 2004), Astrozyten (Krumbholz et al. 2005), Synoviozyten (Ohata et al. 2005) und Stromazellen des Knochenmarks (Schaumann et al. 2007) gezeigt werden. Gesunde B-Zellen exprimieren kein BAFF, jedoch wurde die Produktion von BAFF in maligne entarteten Zellen z.B. in Non-Hodgkin-Lymphomen nachgewiesen (Novak et al. 2004).

Die Regulation von BAFF erfolgt durch verschiedene Zytokine. IL-10 und IFN- $\gamma$  führen zu einem Anstieg der BAFF-Expression in Monozyten. Ferner gehören IFN- $\alpha$  und CD40L zu den BAFF-Induktoren. IL-4 führt zu einer Reduzierung der BAFF-Expression (Nardelli et al. 2001; Litinskiy et al. 2002).

### **1.2.2 Rezeptoren von BAFF und physiologische Wirkung**

Eine exogene Zufuhr von BAFF führt in Mäusen zu einem Anstieg der Immunglobuline und der B-Lymphozyten-Zahl (Moore et al. 1999; Khare et al. 2000), eine Verringerung des BAFF-Spiegels durch Zufuhr löslicher BAFF-Rezeptoren führt zu einem Abfall aller peripheren reifen B-Zell-Typen (Yan et al. 2000; Yu et al. 2000). Die Reifung und das Überleben von B-Zellen sowie die Produktion von Immunglobulinen durch Plasmazellen werden durch BAFF reguliert (Batten et al. 2000; Thompson et al. 2000). Bislang wurden drei BAFF-bindende Rezeptoren, BAFF-R, BCMA (B cell maturation antigen) und TACI (transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor) beschrieben, die hauptsächlich von B-Lymphozyten exprimiert werden (Mackay and Ambrose 2003). BCMA und TACI können nicht nur mit BAFF sondern auch mit APRIL interagieren (Dillon et al. 2006). Alle drei Rezeptoren gehören zur TNF-Rezeptor-Familie welche durch eine cysteinreiche Domäne (CDR= Cystein rich domains) charakterisiert ist (Abb.1). Die TNF-Rezeptor-Familie kann in zwei Klassen unterteilt werden. Zum einen gibt es TNF-Rezeptoren die über sogenannte „death domains“ verfügen und Apoptose auslösen können. Zum anderen gibt es TRAF- (engl. TNF - receptor associated factor) assoziierte Bindestellen, zu denen die drei BAFF-Rezeptoren zählen. TRAF induzieren Signale in der Zelle, die für Proliferation und Überleben zuständig sind (Chung et al. 2002).



**Abb. 1: Die Interaktion von BAFF mit seinen Rezeptoren und ihre Funktion im Immunsystem** BAFF wird hauptsächlich von Zellen myeloiden Ursprungs wie Monozyten und Makrophagen exprimiert. Durch eine Proteinase vom Furin-Typ (dargestellt durch Schere) kann die membranintegrierte Form abgespalten werden, so dass das Zytokin anschließend als lösliche Form vorliegt. BAFF bindet an drei verschiedene Rezeptoren, BAFF-R, BCMA und TACI die von B-Zellen, Plasmazellen und T-Zellen exprimiert werden. Die höchste Affinität zu BAFF (dargestellt durch die Anzahl der Pfeile) hat BAFF-R. Unten sind die Funktionen, welche die jeweiligen Rezeptoren vermitteln, angezeigt. Grafik modifiziert nach Schneider 2003.

Für die wesentlichen Aufgaben von BAFF in der B-Zellreifung wird die Signalweiterleitung über BAFF-R verantwortlich gemacht (Mackay and Ambrose 2003; Ng et al. 2004). BAFF<sup>-/-</sup> transgene Mäuse sind BAFF-R<sup>-/-</sup> transgenen Mäusen (Mackay et al. 1999) sehr ähnlich. BAFF-R hat die höchste Affinität zu BAFF und bindet ausschließlich BAFF. Der BAFF-R Rezeptor wird auf B-Lymphozyten und peripheren Gedächtniszellen exprimiert (Yan et al. 2001; Gorelik et al. 2004). Die Expressionsdichte von BAFF-R auf B-Zellen sowie die Affinität zu BAFF nimmt dabei mit deren Reifegrad zu. B-Zellen reifen im Knochenmark aus einer pluripotenten Stammzelle antigenunabhängig und wandern als unreife B-Zelle aus dem Knochenmark aus. Über die intermediären Stadien T1-3 entwickeln sie sich in der

Peripherie zu reifen B-Lymphozyten. Eine Induktion antiapoptotischer Signale erfolgt durch die Bindung von BAFF an BAFF-R, somit resultiert das Zytokin in einem Überlebenssignal für B-Lymphozyten. Je höher das Reifestadium der B-Zelle (T2/3 Stadium), desto höher ist die Abhängigkeit des Überlebens der Zelle von BAFF. Diese Funktion von BAFF in der B-Zellreifung wird durch transgene BAFF-/- bzw. BAFF-R-/- Mäusmodelle bestätigt. Bis zum T1-Zellstadium entwickelten sich B-Zellen dieser Mäuse normal, ab dem T2 Zellstadium zeigt sich eine zunehmende Störung der B-Zellreifung (Hsu et al. 2002; Mackay and Ambrose 2003; Cancro 2004).

Aktivierte T-Zellen können ebenfalls BAFF-R exprimieren (Ng et al. 2004), jedoch ist eine Costimulation über diesen Rezeptor in der Literatur umstritten, da kein Einfluss auf die T-Zellzahl in BAFF-/- transgenen Mäusen detektiert werden konnte (Moisini and Davidson 2009). BCMA und TACI konnte bislang keine tragende Funktion in der B-Zellreifung nachgewiesen werden. Transgene BCMA-/- und TACI-/- Mäuse zeigen eine normale Entwicklung der B-Lymphozyten.

BCMA besitzt nur eine geringe Affinität zu BAFF und wird in sehr frühen Reifungsstadien der B-Lymphozyten sowie auf Plasmablasten und Plasmazellen exprimiert. Durch die Bindung von BAFF oder APRIL an diesen Rezeptor werden antiapoptotische Signalkaskaden induziert, jedoch zeigten BCMA-negative Mäuse keine Veränderung der peripheren B-Lymphozytenanzahl. Die Hauptfunktion des BCMA-Rezeptors ist es das Überleben der Plasmazellen im Knochenmark zu gewährleisten. BCMA -/- transgene Mäusen zeigten eine Plasmazellreduktion um 80 %. BCMA hat also eine große Bedeutung für das Überleben von Plasmazellen im Knochenmark (Xu and Lam 2001; O'Connor et al. 2004).

TACI ist ein weiterer BAFF-Rezeptor welcher von reifen B-Zellen, T-Zellen, Plasmablasten und nach Stimulation auch von Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert wird (Chang et al. 2006; Tangye et al. 2006). Durch die Bindung von BAFF oder APRIL kommt es zu einer Induktion proapoptotischer Signale. TACI kann von der Zellmembran abgespalten werden und dadurch lösliche BAFF-Moleküle abfangen (Bossen and Schneider 2006). TACI-/- transgene Mäuse weisen eine erhöhte Anzahl peripherer B-Lymphozyten auf (Schneider and Tschopp 2003; Salzer et al. 2007). Im Gegensatz zum BAFF-R hat TACI einen negativ regulatorischen Einfluss auf die B-Zell Homöostase (Yan et al. 2001). Des Weiteren führt vor allem TACI aber auch BAFF-R zum T-Zell unabhängigen Immunglobulin (Ig) Klassenwechsel von IgM zu IgG und IgA in B-Lymphozyten (Castigli et al. 2005; Sutherland et al. 2006).

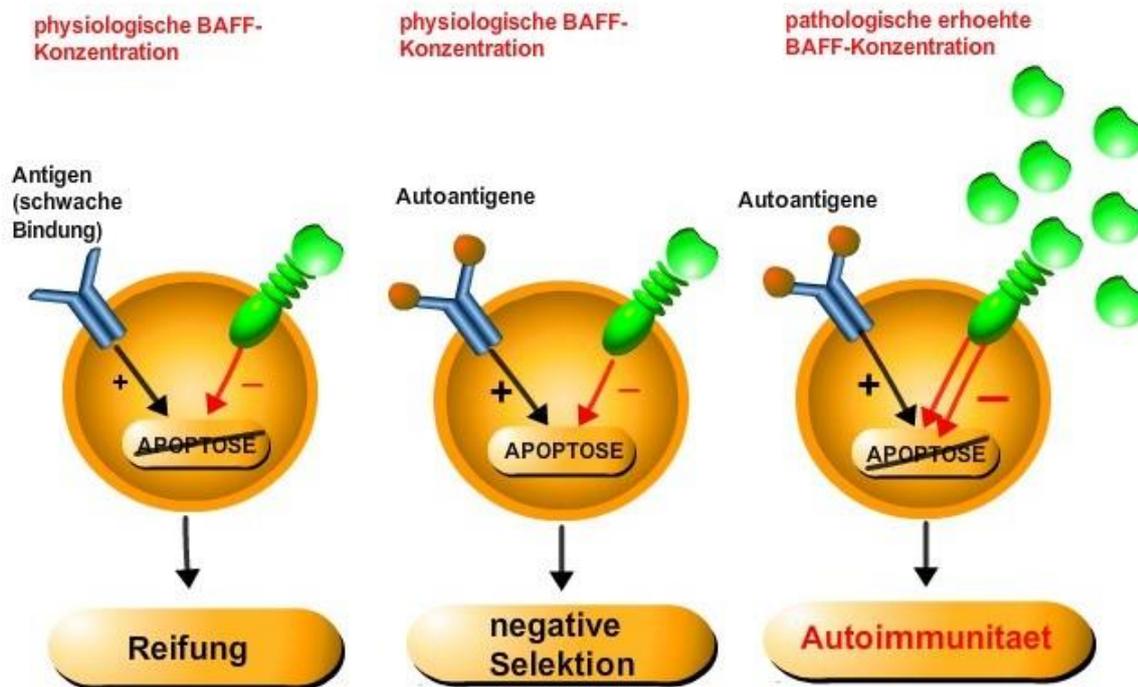
### 1.2.3 Die Assoziation von BAFF mit Autoimmunerkrankungen und Transplantation

Abgesehen von erhöhten BAFF-Serumspiegeln in hämatologischen Tumorerkrankungen konnte eine Überexpression von BAFF vor allem bei Autoimmunerkrankungen detektiert werden (Tangye et al. 2006). Systemische Autoimmunerkrankungen wie das Sjögren Syndrom (SS), der systemische Lupus erythematoses (SLE), die rheumatoide Arthritis (RA) und die Wegener Granulomatose sind mit erhöhten BAFF-Serumspiegeln assoziiert (Cheema et al. 2001; Zhang et al. 2001; Groom et al. 2002; Krumbholz et al. 2005). Eine Korrelation der Krankheitsaktivität mit der Serum-BAFF-Konzentration konnte bei SS-Patienten und bei Patienten mit Colitis ulcerosa nachgewiesen werden (Mariette et al. 2003, Zhang et al. 2016). In Hirnläsionen von Patienten mit Multipler Sklerose konnte eine lokal erhöhte BAFF-Expression detektiert werden, ebenso zeigten sich stark erhöhte BAFF-Titer in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit einer RA. Zudem wurden erhöhte BAFF-Konzentrationen im Urin von Patienten mit Lupusnephritis nachgewiesen. Durch diese Studien lässt sich auf eine Mitwirkung von BAFF auf das lokale Entzündungsgeschehen schließen (Cheema et al. 2001; Krumbholz et al. 2005, Phatak et al. 2017). Zudem wurden bei mit HIV oder Hepatitis C infizierten Patienten Autoimmunphänomene beobachtet, die mit erhöhten BAFF-Spiegeln einhergingen (Stohl et al. 2002; Toubi et al. 2006).

Im Tiermodell fanden sich weitere Hinweise auf einen ursächlichen Zusammenhang zwischen BAFF-Überexpression und Autoimmunität. So zeigten BAFF-transgene Mäuse eine Fehlregulation in der B-Zell-Homöostase mit einer B-Zellhyperplasie, erhöhten Immunglobulinspiegeln und vermehrten Auftreten von Autoantikörpern. Klinisch zeigten sie Symptome die dem systemischen Lupus erythematoses und dem Sjögren Syndrom ähnelten (Mackay et al. 1999; Gross et al. 2000; Khare et al. 2000; Groom et al. 2002; Kalled et al. 2005; Mackay and Leung 2006; Groom et al. 2007). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde eine Hypothese zur Entstehung von Autoimmunität aufgrund einer BAFF-Dysregulation formuliert. BAFF spielt eine wichtige regulierende Rolle in der Reifung von B-Lymphozyten und der Determinierung des peripheren B-Zellpools (Thomas et al. 2006). Durch eine BAFF-Überexpression werden die peripheren Toleranzmechanismen der B-Zelle in ihrer Funktion gestört.

Unter physiologischen BAFF-Konzentrationen differenzieren naive B-Lymphozyten, die eine schwache Bindung zu einem Antigen aufbauen, zu reifen B-Lymphozyten. Die antiapoptotischen Signale von BAFF überwiegen den schwachen apoptotischen

Signalen die durch das Antigen vermittelt werden. Bindet ein Autoantigen jedoch hochaffin an den B-Zell-Rezeptor, löst das sehr starke apoptotische Signale in der B-Zelle aus. Diese Signale können nicht durch die antiapoptotische Wirkung von BAFF ausgeglichen werden, die B-Zelle geht zugrunde. Unter einer pathologisch erhöhten BAFF-Konzentration werden der Zelle jedoch so starke antiapoptotische Signale vermittelt, dass sie trotz Bindung eines Autoantigens überleben und dem programmierten Zelltod entgehen kann (Abb. 2) (Bannish et al. 2001; Mackay and Browning 2002).



**Abb. 2: Die Rolle von BAFF in der negativen Selektion von B-Zellen und die Entstehung von Autoimmunität.**

Wenn unter physiologischen BAFF-Konzentrationen ein Fremdantigen an den B-Zell-Rezeptor bindet wird die Zelle zur Reifung stimuliert, da antiapoptotischen Signale überwiegen. Erhält die B-Zelle ein starkes apoptotisches Signal z.B. durch ein Autoantigen wird sie eliminiert, da die überlebensfördernden Signale nicht ausreichen, um die Zelle vor dem programmierten Zelltod zu bewahren. Pathologisch erhöhte BAFF-Konzentrationen vermitteln sehr starke antiapoptotische Signale. Dadurch können naive B-Lymphozyten trotz der Bindung eines Autoantigens überleben und zu reifen B-Lymphozyten ausdifferenzieren. Grafik modifiziert nach Mackay und Browning 2002.

Da BAFF eine zentrale Rolle in der Entstehung von Autoimmunität spielt, wurden BAFF-Antagonisten zur Therapie von Autoimmunerkrankungen entwickelt, die im Tiermodell vielversprechende Behandlungserfolge zeigen. Mehrere Therapeutika die in das BAFF-System eingreifen befinden sich in der klinischen Erprobung. Belimumab, ein monoklonaler Antikörper gegen lösliches BAFF, ist bereits zur Therapie des systemischen Lupus erythematodes zugelassen (Collins et al. 2016; Hui-Yuen et al.

2015; Liu and Davidson 2011; Wei et al. 2016). Auch zeigt Belimumab in der Behandlung des Sjögren Syndroms in Studien vielversprechende Ergebnisse (De Vita et al. 2015, Quartuccio et al. 2016).

Nach neueren Erkenntnissen spielen nicht nur T-Zellen sondern auch B-Zellen eine wichtige Rolle in der Ätiologie der Abstoßungsreaktion nach Allotransplantation. Bei Patienten nach Nieren- und Knochenmarktransplantation wurden erhöhte BAFF-Serumspiegel detektiert. Auch eine Assoziation zwischen erhöhten BAFF-Serumleveln und dem Vorkommen sowie dem Schweregrad einer Glomerulopathie nach Nierentransplantation konnte nachgewiesen werden. Die von BAFF abhängigen Mechanismen in der Abstoßungsreaktion konnten jedoch bisher nicht ausreichend erklärt werden (Lehnhardt et al. 2012; Parsons et al. 2010; Sango et al. 2016; Sarantopoulos et al. 2007; Xu et al. 2009; Ye et al. 2004).

### ***1.3 Vorstellung der verwendeten Immunsuppressiva***

Eine immunsuppressive Therapie ist immer dann indiziert wenn das Immunsystem eine unerwünschte Reaktion im Körper hervorruft. In der Behandlung von Autoimmunerkrankungen soll durch Immunsuppressiva der Schädigung körpereigenen Gewebes entgegengewirkt werden. Zur Prophylaxe der Abstoßungsreaktion werden Immunsuppressiva in der Transplantationsmedizin eingesetzt. Aufgrund der Komplexität des Immunsystems gibt es viele unterschiedliche Ansatzpunkte der Therapeutika, allen gemeinsam ist, dass sie unspezifisch wirken. Infolgedessen werden nicht nur die ungewollten Immunreaktionen, sondern auch lebensnotwendige Abwehrfunktionen des Immunsystems supprimiert. Die Therapie einer Abstoßungsreaktion des Immunsystems auf eine Transplantation und Autoimmunerkrankungen hat daher einen engen Handlungsspielraum. Zwar ist es notwendig die störende Immunreaktion des Körpers möglichst effizient zu unterdrücken, jedoch muss eine zu starke Schwächung des Immunsystems vermieden werden, um einen ausreichenden Schutz vor schwerwiegenden Infektionen zu gewährleisten und die Entstehung von Tumorerkrankungen zu vermeiden (Bradley and Elson 1971).

Im folgendem werden die in dieser Arbeit verwendeten Immunsuppressiva Rapamycin, Cyclosporin A, Methotrexat, Mycophenolatmofetil und der Immunmodulator Valproinsäure vorgestellt.

### **1.3.1 Rapamycin, - ein m-TOR (mammalian target of rapamycin) -Antagonist**

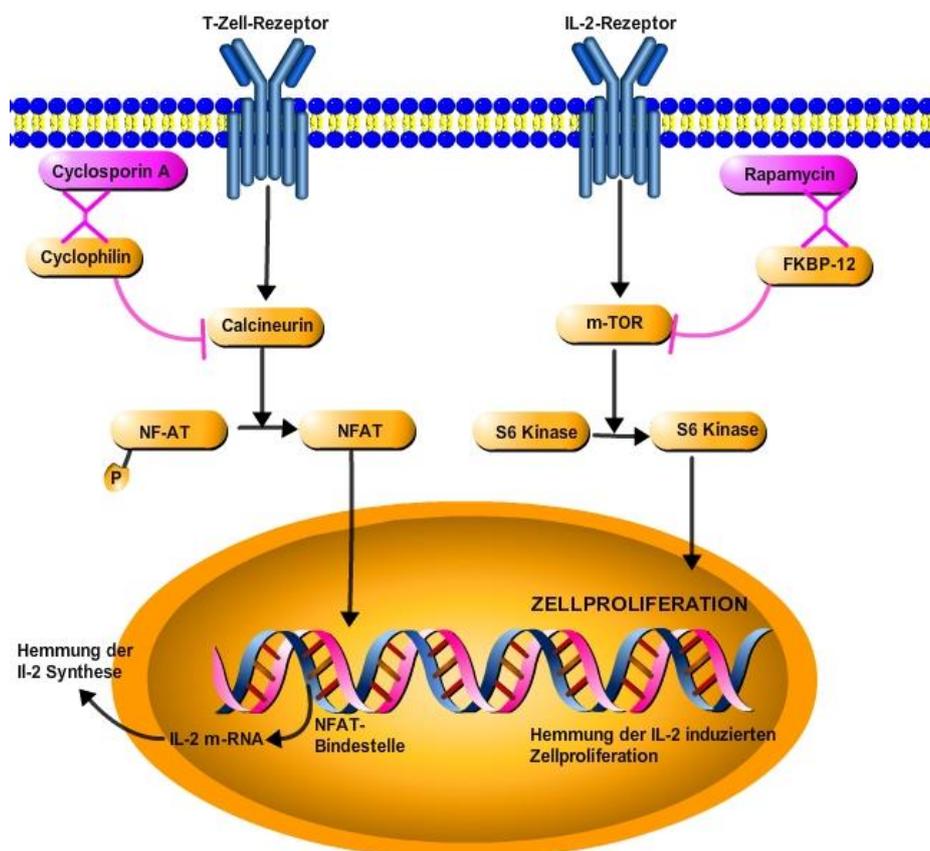
Rapamycin (auch unter dem Namen Sirolimus bekannt) ist eine Makrolidlaktone, die im Jahre 1975 erstmalig aus einem Bodenzpilz isoliert wurde. Rapamycin gehört zu den m-TOR Antagonisten. Durch Rapamycin wird vor allem die Zytokin-abhängige Aktivierung und Proliferation von T-Zellen inhibiert. Rapamycin bindet intrazellulär an das Immunophilin FK506-bindendes Protein-12 (FKBP12) und inaktiviert dadurch die Serin-Threonin-Kinase m-TOR (Zheng et al. 1995). m-TOR spielt eine wichtige Rolle in der Kontrolle und Regulierung der Proteinsynthese und des Zellzyklus. Durch die Inaktivierung werden die Zellen in der G1 Phase des Zellzyklus angehalten und somit die Proliferation verhindert (Abb. 3) (Sehgal 1998; Loewith et al. 2002).

Rapamycin wird in der Prophylaxe der allogenen Organabstoßung meist in der Kombination mit Glucocorticoiden und Calcineurininhibitoren eingesetzt. Im Gegensatz zu Cyclosporin ist Rapamycin nicht nephrotoxisch, es können jedoch unerwünschte Wirkungen wie Dyslipidämie, Myelosuppression, Infektionsanfälligkeit und Wundheilungsstörungen auftreten (Mehrabi et al. 2006; Augustine et al. 2007). m-TOR spielt auch eine Rolle in der Tumorphagenese und so zeigt Rapamycin *in vitro* und *in vivo* einen antitumorösen Effekt (Vignot et al. 2005; Gibbons et al. 2009). Everolimus, ein weiterer m-TOR Antagonist, ist bereits zur Therapie des fortgeschrittenen Mammakarzinoms in Kombination mit einem Antiöstrogen zugelassen (Lousberg und Jerusalem 2017). Aufgrund seiner antiproliferativen Wirkung werden in der Kardiologie Studien zur Anwendung mit Rapamycin beschichteter Stents durchgeführt, die vielversprechende Ergebnisse aufweisen (Jensen et al. 2016; Thim et al. 2012; Degertekin et al. 2002; Han et al. 2009).

### **1.3.2 Cyclosporin A- ein Calcineurininhibitor**

Cyclosporin A (CsA), das aus dem Pilz *Tolypocladium inflatum* isoliert wird, gehört zu der Wirkstoffklasse der Calcineurininhibitoren. Es handelt sich um ein lipophiles, cyclisches Peptid, das aus elf Aminosäuren besteht. CsA bindet an den zytoplasmatischen Rezeptor Cyclophilin, wodurch die Proteinphosphatase Calcineurin inhibiert wird. Calcineurin reguliert den Transkriptionsfaktor NFAT (nuclear factor of activated T-cells), der für die Synthese von Interleukin-2 (IL-2), CD40L (Cluster of differentiation 40 ligand) und weiteren Lymphokinen, die in der Aktivierung von T-

Lymphozyten und ihrer klonalen Expansion eine wichtige Rolle spielen, verantwortlich ist (Abb. 3) (Bennett and Norman 1986; Kahan 1989; Encke et al. 2004). Die Behandlung der Abstoßungsreaktion bei Knochenmark- und Nierentransplantation stellt die Hauptindikation für eine Cyclosporintherapie dar, jedoch wird CsA auch in der Therapie von Autoimmunerkrankungen, wie zum Beispiel der Myasthenia gravis eingesetzt. Ein Vorteil von CsA ist, dass es keine Knochenmarksdepression, die oftmals durch andere Immunsuppressiva hervorgerufen wird, auslöst. Als unerwünschte Wirkungen werden vor allem Nierenfunktionsstörung, sowie Leberfunktionsstörungen, Tremor, Hypertrichose und die Gingivahyperplasie beobachtet (Faulds et al. 1993). In der Langzeittherapie ist zudem ein diabetogener Effekt festzustellen (Kutkuhn et al. 1997).



**Abb. 3: Wirkungsmechanismen der Immunsuppressiva Rapamycin und Cyclosporin A**

Cyclosporin A bindet intrazellulär an Cyclophilin. Durch diesen Komplex wird Calcineurin inhibiert, welches die Dephosphorylierung von NF-AT katalysiert. NFAT ist ein Transkriptionsfaktor der für die Bereitstellung von Zytokinen wie IL-2 eine wichtige Rolle spielt. Diese Botenstoffe sind an der Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten beteiligt. Rapamycin geht eine Bindung mit dem Immunophilin FKBP-12 ein und antagonisiert m-TOR. M-TOR spielt in der Regulierung der Zellproliferation und des Zellzyklus eine entscheidende Rolle. Grafik modifiziert nach Resch 2010.

### 1.3.3 Mycophenolatmofetil – ein Antimetabolit

Mycophenolatmofetil (MMF) ist ein Prodrug das im Körper zu seinem aktiven Metaboliten Mycophenolsäure umgewandelt wird. Diese hemmt selektiv und reversibel die Inosinmonophosphat-Dehydrogenase, ein Schlüsselenzym der „*De-novo*“ Purinbiosynthese. Purine sind für den Aufbau von Nukleinsäuren unentbehrlich. Da Lymphozyten, im Gegensatz zu anderen Zellen, nicht auf einen Wiederverwertungsstoffwechsel zur Deckung ihres Purinbedarfs zurückgreifen können, wird ihre DNA und RNA Synthese und damit ihre Fähigkeit zur Proliferation selektiv durch Mycophenolsäure gehemmt. Die orale Bioverfügbarkeit ist sehr hoch und es wird schnell zu seinem aktiven Metaboliten Mycophenolsäure umgewandelt (Natsumeda and Carr 1993; Allison and Eugui 2000).

MMF ist zur Prophylaxe der akuten Organabstoßung nach allogener Leber-, Herz- und Nierentransplantation in Kombination mit Cyclosporin A und Glukokortikoiden zugelassen (Wiesner et al. 2001; Villarroel et al. 2009). Zulassungsüberschreitende Anwendung findet MMF auch in Autoimmunerkrankungen wie z. B. Myasthenia gravis, Lupus erythematodes und Psoriasis (Glicklich and Acharya 1998; Hauser et al. 1998; Surjushe and Saple 2008).

Gastrointestinale Beschwerden wie Diarrhoe und Nausea und eine Myelosuppression sind die am häufigsten beobachteten unerwünschten Wirkungen unter MMF-Therapie (Epinette et al. 1987; Sollinger 1995; van Besouw et al. 1999).

### 1.3.4 Methotrexat - ein Folsäureantagonist

Methotrexat (Mtx) hat eine zytostatische und eine immunsuppressive Wirkung und gehört zu der Wirkstoffklasse der Antimetabolite. Es greift in den Folsäurestoffwechsel ein, der essentiell für die Nucleotidbiosynthese ist. Durch Hemmung der Dihydrofolatreduktase wird die DNS-Synthese unterbunden und die Zelle stirbt in der S-Phase des Zellzyklus ab. Deshalb sind vor allem Zellen mit einer hohen Teilungsrate von der Mtx-Wirkung betroffen. In hohen Dosierungen wird Mtx in der Therapie verschiedener Tumorerkrankungen eingesetzt (Bleyer 1978; McGuire 2003).

In niedriger Dosierung wird Mtx bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie der Psoriasis, der rheumatoiden Arthritis, der Wegener Granulomatose und der biliären Zirrhose verwendet (Kaplan 1998; Cronstein 2005; Specks 2005). Dabei wird ein alternativer Wirkungsmechanismus diskutiert. Mtx wird in die Zelle aufgenommen und

dort zu einem Polyglutamat umgewandelt. Dieses führt durch die Inhibierung mehrerer Stoffwechselreaktionen zu einem Anstieg des intrazellulären Adenosinspiegels. Infolgedessen wird Adenosin vermehrt an den Extrazellulärraum abgegeben und wirkt dort an Adenosinrezeptoren. Diese haben eine hemmende Wirkung auf die Expression von Interleukinen wie IL-1 oder IL-8 (Kremer 1994; Cutolo et al. 2001).

Den unerwünschten Wirkungen wie gastrointestinale Beschwerden, Leber und Nierenschädigung sowie Knochenmarksdepression kann durch Gabe von Folsäure (sog. „Leukovorin-Rescue“) effektiv entgegengewirkt werden (Bertino et al. 1971; Strober and Menon 2005).

### 1.3.5 Valproinsäure - ein Immunmodulator

Valproinsäure (VPA) ist eine synthetisch hergestellte Carbonsäure, die seit Jahrzehnten in der antiepileptischen Therapie generalisierter und fokaler Krampfanfälle sowie in der Behandlung von bipolaren Störungen, Migräne und neuropathischen Schmerzen eingesetzt wird. Dabei wirkt VPA über einen Anstieg des Plasmaspiegels des inhibitorischen Neurotransmitters  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) (Loscher 1999; Johannessen 2000).

Neben diesem Wirkmechanismus wurde VPA als Histondeacetylaseinhibitor (HDACI) identifiziert. Durch eine Blockade der Deacetylierung von Histonen öffnet sich die Struktur der DNS und wird dadurch in einen transkriptionell aktiveren Zustand gebracht. Je nachdem welche Gene vermehrt transkribiert werden, kann es zu Zellproliferation, Zelldifferenzierung aber auch zu Apoptose kommen. Antitumorale Effekte sind bereits *in vitro* und *in vivo* nachweisbar. Des Weiteren konnte eine Wirkung von VPA auf solide Tumoren sowie myelodysplastische Syndrom in Studien gezeigt werden (Gottlicher et al. 2001; Duenas-Gonzalez et al. 2008). Außerdem wurde gezeigt dass HDACI immunmodulatorische und antientzündliche Eigenschaften aufweisen. Der dafür verantwortliche Wirkmechanismus ist aber noch nicht ausreichend geklärt (Frikeche et al. 2012; Leoni et al. 2002; Bode et al. 2007).

## **1.4 Fragestellung**

Immunsuppressiva werden bereits effektiv zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen und zur Prophylaxe der Abstoßungsreaktion nach Allotransplantation eingesetzt, ohne dass man oftmals den genauen Wirkmechanismus kennt. BAFF spielt eine wichtige Rolle in der Ätiopathogenese von Autoimmunität und auch in der Transplantationsimmunologie gerät BAFF immer mehr in den Interessenfokus der Forschung.

Ziel dieser Arbeit ist es daher den Einfluss von Immunsuppressiva auf die Expression und Sekretion des B-Zell aktivierenden Faktors der Tumornekrosefamilie BAFF näher zu beleuchten. Sowohl neue Erkenntnisse zu den Wirkmechanismen von Immunsuppressiva als auch zur Regulation des B-Zell-aktivierenden Faktors könnten dadurch aufgezeigt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, gebrauchsfertige Lösungen und Kit

Cytofix/Cytoperm	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Cyclosporin A	Calbiochem, Merck, Darmstadt, D
Destilliertes Wasser (Aqua dest.)	B. Braun, Melsungen, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt, D
Ethanol vergällt, 96 %	Fisher, Saarbrücken, D
FACS Clean/ Flow/ Rinse	Becton Dickinson (BD), Heidelberg, D
Fötale Kälberserum (fetal calf serum = FCS)	Hyclone, Invitrogen, Carlsbad, USA
Isopropanol	Riedel de Häen, Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
Methotrexat	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
Mycophenolatmofetil	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt, D
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA
Perm/Wash-Lösung	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphat buffered saline = PBS) für Zellkultur (steril)	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA
Quantikine human BAFF/Blys ELISA	R&D Systems, WI-Nordenstadt, D
Rapamycin	Calbiochem, Merck, Darmstadt, D

RPMI 1640-Medium (enthält 2 mM stabiles Glutamin)	PAN Biotech, Aldenbach, D
Triton	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
Trypanblau	Carl Roth, Karlsruhe, D
Valproinsäure	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
WST-1 Proliferationsreagenz	Roche, Mannheim, D

### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

1,5 mL-Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht, D
Cellstar® 75 cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen	GreinerBioOne, Frickenhausen, D
Cellstar® Plastikpipetten (5, 10, 25 mL)	GreinerBioOne, Frickenhausen, D
Cellstar® TC-Platte mit 96 Vertiefungen, U-Form	GreinerBioOne, Frickenhausen, D
Cellstar® Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen	GreinerBioOne, Frickenhausen, D
Cryotube™ Einfrierröhrchen (1,8 mL)	Nunc, Langenselbold, D
FACS-Messröhrchen (0,5 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Falcon-Gefäße (15, 25 mL)	Becton Dickinson (BD), Heidelberg, D
Minisart Sterilfilter (Ø: 0,45 µm)	Sartorius, Göttingen, D
Neubauer improved Zählkammer	Brand, Wertheim, D
Sterile Pipettenspitzen mit Filter	Nerbe Plus, Winsen/Luhe, D

### 2.1.3 Geräte

FACS Calibur Durchflusszytometer	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Hettich Universal 32 R Tischzentrifuge	Hettich, Tuttlingen, D
Inverses Lichtmikroskop MBL 3100	Krüss Optronic, Hamburg, D
Pipettierhilfe (Pipet Boy)	Integra Biosciences, Fernwald, D

Multiskan Ex (ELISA-Reader)	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, D
Sterilbank (Class II Type A/B3)	Nuaire, Plymouth, USA
Stickstofftank	Air Liquide, Düsseldorf, D
Vortex-Genie 2 (Vortexer)	Scientific Industries, Bohemia, USA

### 2.1.4 Puffer, Lösungen und Medien

Einfriermedium	Fötale Kälberserum 10 % (v/v) DMSO
FACS-Puffer	1x PBS 10 % (v/v) Fötale Kälberserum 0,1 % (v/v) NaN <sub>3</sub>
Kulturmedium für U-937 Zelllinie	RPMI 1640 (enthält 2 mM stabiles Glutamin) 10 % (v/v) Fötale Kälberserum 0,5 % (v/v) Penicillin/Streptomycin
PBS (10x)	1,45 M NaCl 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 24,17 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O gelöst in 1 L Aqua dest. pH: 7,2-7,35
PBS (1x)	10 % (v/v) PBS (10x) Mit Aqua dest. auf 1 L auffüllen
Trypanblaufärbelösung	PBS (1x) 0,4 % Trypan-Blau

### 2.1.5 Antikörper

BAFF (FITC)	Ratte anti human, monoklonal	Acris Antibodies, San Diego, USA
BAFF (FITC)	Ratte anti human	Axxora, Lörrach, D

	monoklonal	
BAFF (FITC)	Maus anti human, monoklonal	R&D Systems, WI-Nordenstadt, D
BAFF (Atto-488)	Ratte anti human, monoklonal	Axxora, Lörrach, D
CD-14 (PerCP-CY5.5)	Maus anti human, monoklonal	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Isotyp (Atto-488)	Ratte IgG <sub>2a</sub>	Axxora, Lörrach, D
Isotyp (CFS)	Maus IgG <sub>1</sub>	R&D Systems, WI- Nordenstadt, D
Isotyp (FITC)	Ratte IgG <sub>2a</sub>	Acris Antibodies, San Diego, USA
Isotyp (FITC)	Ratte IgG <sub>2a</sub>	Southern Biotech, Birmingham, USA
Isotyp (PerCP-CY5.5)	Maus IgG <sub>2b</sub>	BD Pharmingen, Heidelberg, D

### 2.1.6 Software

Cellquest	PD Pharmingen, Heidelberg, D
Excel 2002	Microsoft
Graphpad Prism	Graph Pad Software, La Jolla, CA, USA
Office Word 2003	Microsoft
WinMDI	The scripps research institute, La Jolla, CA, USA

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur**

#### **2.2.1.1 Die Zelllinie U-937**

Für die vorliegende Arbeit wurde die humane Zelllinie U-937 verwendet, welche sich aus malignen Zellen ableitet, die im Jahre 1974 einem Pleuraerguss eines Patienten mit generalisiertem histiozytärem Lymphom entnommen wurden. Es handelt sich um eine immortalisierte Suspensionskultur, die monozytäre Eigenschaften aufweist (Sundstrom and Nilsson 1976). Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in wasserdampfgesättigter Atmosphäre in Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) kultiviert. Als Medium diente RPMI, das mit 10 % fetalem Kälberserum und 0,5 % Penicillin/Streptomycin supplementiert wurde. Das Fetale Kälberserum wurde vor der Zugabe mit einer Spritze und einem Sterilfilter (Porendurchmesser: 0,45 µm) filtriert. Bezugsquelle der Zelllinie: AG Prof. K.T. Preissner, Abteilung Biochemie des Universitätsklinikums Giessen.

#### **2.2.1.2 Zellpassage und Kryokonservierung**

Alle Arbeiten mit U-937-Zellen wurden unter sterilen Bedingungen im Zellkulturlabor an Sicherheitswerkbänken durchgeführt, um eine mikrobielle Kontamination zu vermeiden. Die Zellpassage erfolgte, je nach Zelldichte, alle zwei bis drei Tage. Dazu wurde der Inhalt der Kulturflasche durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in ein 15 mL-Falcon-Gefäß überführt. Nach der Zentrifugation (1200 rpm, 4 min) wurde der Überstand verworfen und durch frisches, 37 °C warmes Medium ersetzt. Zur Zellpassage wurden je nach Zelldichte ½-1/20stel der Zellen in eine Kulturflasche überführt und mit frischem Medium weiter kultiviert.

Mittels Kryokonservierung können Zellen über einen längeren Zeitraum hinweg in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden. Zum Einfrieren wurden die Zellen in ein 15 mL-Falcon-Gefäß überführt und zentrifugiert (1200 rpm, 4 min). Das erhaltene Zellpellet wurde in 1 mL Einfriermedium resuspendiert, auf zwei Kryotubes verteilt und für 24 h in Isopropanol bei – 80 °C gelagert. Isopropanol gewährleistet ein langsames und schonendes Einfrieren der Zellen, bei einer Abkühlrate von 1 °C / min. Danach wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff gelagert. Zum Auftauen der Zellen wurden diese aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und mit Hilfe eines 37 °C warmen Wasserbads möglichst schnell erwärmt, da das im Einfriermedium enthaltene DMSO zytotoxisch wirkt. Anschließend wurden die Zellen in Medium resuspendiert und

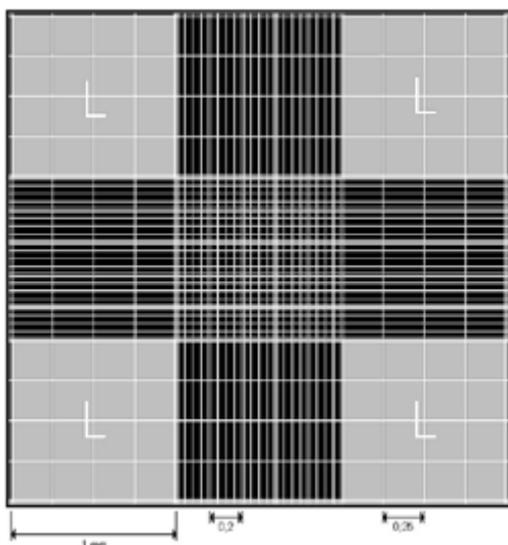
zentrifugiert (1200 rpm, 4 min). Dieser Arbeitsschritt wurde ein Mal mit einem größeren Medienvolumen wiederholt, um das DMSO zu entfernen. Daraufhin wurden die Zellen in einem 37 °C warmen Medium wiederaufgenommen und in einer Kulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) unter Standardbedingungen kultiviert. Der erste Mediumwechsel erfolgte am darauffolgenden Tag.

### 2.2.1.3 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Die Kontrolle der Zellvitalität wurde mit Hilfe der Trypanblaufärbung durchgeführt. Trypanblau färbt alle toten Zellen blau an, da es Farbstoffanionen besitzt die an zytosolische Proteine binden und diese nur bei defekter Zellmembran in die Zelle eindringen können. Vitale Zellen mit intakter Zellmembran bleiben farblos. Es wurden 20 µL der Zelllösung mit 20 µL der Trypanblaulösung eine Minute inkubiert und in die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Gesamtheit aller Zellen, blaue als auch farblose wurden gezählt. Die Zytotoxizität ergab sich aus dem prozentualen Anteil der toten Zellen an der Gesamtzellzahl.

Zur Ermittlung der Zellzahl der Zellsuspension wurden ausschließlich die vitalen, farblosen Zellen in 4 Großquadraten gezählt (Abb. 4). Da ein Großquadrat einem Volumen von 0,1 µL entspricht, konnte die Zellzahl pro mL, unter Berücksichtigung der Vorverdünnung, nach folgender Formel berechnet werden:

Zellzahl pro mL = Mittelwert der Zellzahl aus den vier Großquadraten x Verdünnung x 10000



**Abb. 4: Neubauer improved Zählkammer.**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 4 Großquadrate (grau) bestehend aus 16 Kleinquadraten ausgezählt.

### 2.2.1.4 Zellstimulation

Zur Zellstimulation wurden die Zellen aus der Kulturflasche in ein 15 mL-Falcon-Gefäß überführt, zentrifugiert (1200 rpm, 4 min), das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert und dann mit Hilfe der Neubauer improved Zählkammer die Zellzahl bestimmt (s. S. 2.2.1.3 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität S. 22f). Die Zelllösung wurde mit Kulturmedium auf die benötigte Zellzahl von  $5 \times 10^4$  Zellen pro mL verdünnt, und es folgte die Aussaat der Zellen in die entsprechende Zellkulturplatte.

Die Stimuli wurden dazupipettiert. Als Lösungsmittel der Stimuli kamen DMSO sowie Aqua dest. zum Einsatz. Zur Herstellung der jeweiligen Konzentrationen wurden Verdünnungsreihen der Stammlösung angelegt (Tab. 1). Als Negativkontrolle wurde bei jedem Versuch eine Stimulation mit dem entsprechenden Lösungsmittel durchgeführt. Nach der Zugabe der Stimuli wurden die Zellen für den indizierten Stimulationszeitraum bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> weiter kultiviert und anschließend geerntet (s. Kap. 2.2.1.5 Zellernte S. 23 f).

Stimulus	Cyclosporin A	Rapamycin	Methotrexat	Valproinsäure	Mycophenolatmofetil
Lösungsmittel	DMSO	DMSO	DMSO	Aqua dest.	DMSO
Konzentration	2 nmol/L	2 nmol/L	0,1 nmol/L	5 µmol/L	0,1 nmol/L
	20 nmol/L	10 nmol/L	1 nmol/L	10 µmol/L	1 nmol/L
	200 nmol/L	20 nmol/L	10 nmol/L	50 µmol/L	10 nmol/L
	2000 nmol/L	100 nmol/L	100 nmol/L	100 µmol/L	100 nmol/L
			1 µmol/L	500 µmol/L	1 µmol/L
			10 µmol/L	1 mmol/L	10 µmol/L

**Tab. 1: Stimuli mit den jeweils verwendeten Konzentrationen und Lösungsmitteln.**

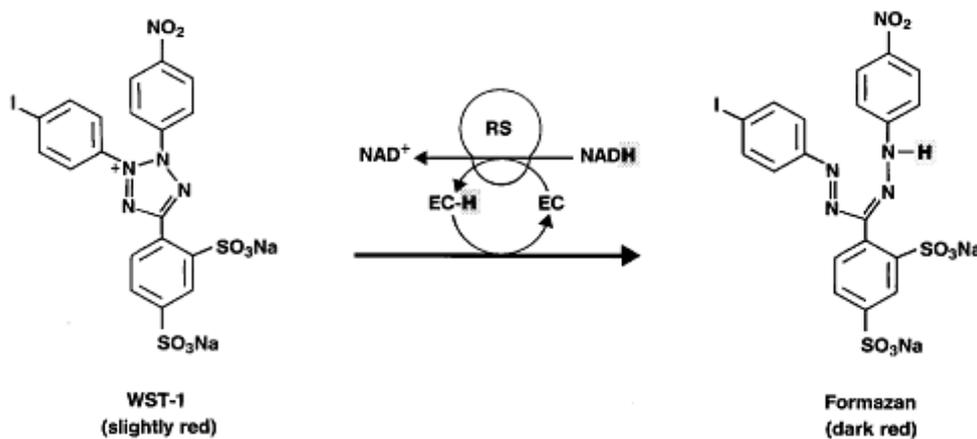
### 2.2.1.5 Zellernte

Vor der Zellernte wurde die Zellmorphologie mit Hilfe des Lichtmikroskops beurteilt. Vitale Zellen lagen dabei vereinzelt vor und die Zellmembran erschien glatt. Zur Zellernte wurden die Zellen durch Auf- und Abpipettieren aus der Kulturflasche entnommen, in einem 15 mL-Falcon-Gefäß überführt und zentrifugiert (1200 rpm, 4 min). Der Zellkulturüberstand wurde für zukünftige Analysen (ELISA) in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt, zentrifugiert (10.000 rpm, 10 min) um Zellbestandteile zu entfernen und eingefroren. Die geernteten Zellen wurden in phosphatgepufferte Salzlösung resuspendiert, und erneut zentrifugiert (1200 rpm, 4 min), um

Kulturmediumrückstände zu entfernen. Anschließend wurden sie weiterverwendet.

### 2.2.2 WST-1 Assay

Als Maß für die Vitalität der Zellen nach Stimulation, wurde ihre metabolische Aktivität mit Hilfe des WST-1 Assays (WST = water-soluble tetrazolium salt) gemessen. WST ist ein Tetrazoliumsalz, das durch die mitochondriale Succinatdehydrogenase lebender Zellen zu einem wasserlöslichen Formazansalz reduziert wird. Durch die Reaktion kommt es zu einem Farbumschlag (Abb. 5). Je mehr vitale Zellen vorhanden sind, desto mehr Tetrazolium wird zu Formazan umgesetzt. Die Lichtabsorption, die mit einem Photometer gemessen wird, korreliert dabei mit der Menge an stoffwechselaktiven lebenden Zellen.



**Abb. 5: Reaktion von Tetrazolium zu Formazan durch die mitochondriale Succinatdehydrogenase.**

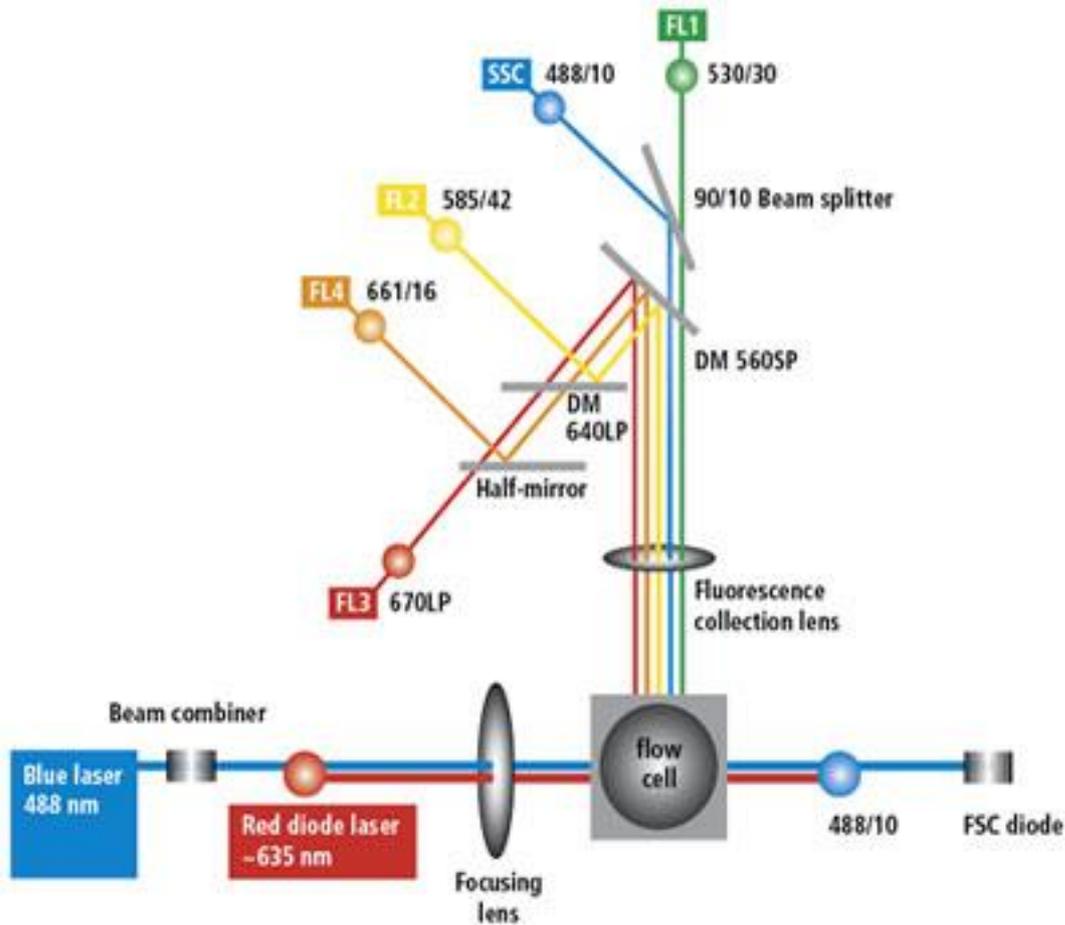
Die Durchführung des WST-1 Assays erfolgte in einer 96-Loch Mikrotiterplatte. Es wurde 100  $\mu$ L Zelllösung mit  $1 \times 10^5$  Zellen / mL ausgesät, stimuliert und inkubiert. Da Triton stark zytotoxisch wirkt, wurde es als Positivkontrolle eingesetzt. Als Negativkontrolle diente die Stimulation mit dem jeweils verwendeten Lösungsmittel. Nach der Stimulationszeit wurden pro Well 10  $\mu$ L des WST-1 Reagenzes hinzu pipettiert und es folgte eine halbstündige Inkubation in humider Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm wurde anschließend die Absorption mit Hilfe eines Photometers gemessen. Das Gemisch aus 10  $\mu$ L WST-1 Reagenz und 100  $\mu$ L RPMI-Medium wurde als Leerwert von den Messwerten abgezogen.

### **2.2.3 Durchflusszytometrie (FACS)**

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um eine Methode, mit der Zellen anhand ihrer Größe, Granularität und Struktur unterschieden werden können. Grundlage der Analyse ist eine Einzelzellsuspension, die in einem Flüssigkeitsstrom an einem Laser vorbeigeleitet wird, wodurch es zu einer Lichtstreuung kommt, die von spezifischen Detektoren erfasst wird. Durch die Markierung von Biomolekülen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern ist es möglich, die Expression dieser Biomoleküle auf und in der Zelle nachzuweisen. Die fluoreszenzmarkierten Zellen emittieren durch den Laser angeregt Photonen. Die Photonenkonzentration wird mittels Photodetektoren eruiert und korreliert mit der Menge an die Zelle gebundener Antikörper (quantitative Analyse).

Der Begriff FACS (FACS = fluorescent activated cell sorting) bezeichnet die geschützte Handelsmarke eines Geräteherstellers und wird oft synonym mit der fluoreszenzaktivierten Durchflusszytometrie gebraucht.

#### **2.2.3.1 Aufbau eines Durchflusszytometers**



**Abb. 6: Schematische Darstellung des Strahlengangs durch ein FACS Calibur-Durchflusszytometer.**

Durch Druck wird ein laminarer Probenstrom erzeugt, der die zu untersuchenden Zellen einzeln an einem Laser passieren lässt. Im FACS-Calibur kommt ein Argonlaser mit 488nm Wellenlänge zum Einsatz. Das vom Laser ausgesandte monochromatische Licht wird mit einer Fokussierungslinse gebündelt bevor es auf die Zelle trifft und es dann zu einer Streuung und Reflexion des Lichtes kommt. Die Streuung des Lichtes in Vorwärtsrichtung wird als forward scatter (FSC) bezeichnet und korreliert mit der Größe der Zelle, d. h. je stärker die Streuung in Vorwärtsrichtung ist, desto größer ist die Zelle. Die Streuung des Lichtes in Seitwärtsrichtung wird als sideward scatter (SSC) bezeichnet und gibt Auskunft über die Granularität der Zellen. Je stärker die Granularität einer Zelle, umso größer die Streuung in Seitwärtsrichtung.

Fluoreszenz-emittiertes Licht wird entsprechend seiner Wellenlängen über verschiedene Photodetektoren detektiert. Das Fluorochrom PerCP-Cy-5.5 wird über den Photodetektor FL-3, Atto-488- und FITC- über den Photodetektor FL-1 erfasst (Abb. 6). Die detektierten Lichtsignale werden in einem angeschlossenen elektronischen System in digitale Daten umgewandelt und gespeichert.

Zur Markierung der intrazellulären, sowie membrangebundenen Antigene wurden die Zellen geerntet, zentrifugiert (1200 rpm, 4 min), in FACS-Puffer resuspendiert und auf eine 96-Loch Mikrotiterplatte mit 100 µL pro Vertiefung pipettiert. Es folgten unterschiedliche Protokolle für die Bestimmung der membrangebundenen und der

intrazellulären Proteine (s.S. 2.2.3.2 Nachweis membranständiger Proteine mittels FACS, s. Kap. 2.2.3.3 Nachweis intrazellulärer Proteine mittels FACS S. 27 f).

### **2.2.3.2 Nachweis membranständiger Proteine mittels FACS**

Nach der Zentrifugation (1200 rpm, 4 min) der Zellen wurden die Überstände verworfen. Um falsch positive Ergebnisse durch unspezifische Bindung der Antikörper auszuschließen, wurden Isotypkontrollen durchgeführt. Eine Isotypkontrolle ist ein Immunglobulin das der gleichen Immunglobulin-Subklasse des Zielantikörpers angehört, das Zielantigen aber nicht spezifisch bindet. Die Negativkontrolle stellten Zellen ohne die Zugabe eines Antikörpers dar (nur 50 µL FACS-Puffer). Antikörper bzw. Isotypen wurden mit FACS-Puffer verdünnt (s. Tab. 2). Pro Well wurde 50 µL der Antikörperverdünnung, Isotypkontrolle oder Negativkontrolle pipettiert und 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden jedem Well 50 µL FACS-Puffer hinzugefügt, diese zentrifugiert (1200 rpm, 4 min) und der Überstand verworfen. Nach einem weiteren Waschvorgang mit 100 µL FACS-Puffer wurde das Zellpellet in 200 µL FACS-Puffer resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen überführt. Es folgte die Messung und Auswertung der Daten (s. Kap. 2.2.3.4 Messung und Auswertung der Daten S. 29 f). Alle Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt und jeder Versuch wurde einmal wiederholt, um die statistische Zuverlässigkeit der Resultate zu erhöhen.

### **2.2.3.3 Nachweis intrazellulärer Proteine mittels FACS**

Für die intrazelluläre Färbung müssen die Zellen vor der Zugabe des Antikörpers fixiert und permeabilisiert werden. Die Fixierung der Zellen erfolgt mittels Formaldehyd und führt zu einer Quervernetzung der Proteine und die Permeabilisierung wird durch Saponin erreicht. Saponin bewirkt eine Erhöhung der Zellpermeabilität, so dass die Antikörper in die Zelle gelangen und an ihre intrazellulären Zielstrukturen binden können. Es handelt sich dabei um ein sehr schonendes und reversibles Verfahren, weshalb die Zellen während des gesamten Prozesses in saponinhaltigen Puffer gehalten werden. Zur Fixierung und Permeabilisierung wurde 100 µL einer Saponin- und Formaldehyd-enthaltenden Lösung (Cytifix/Cytoperm, BD Pharmingen) zu den Proben pipettiert und diese wurden 20 min im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit saponinhaltiger Waschlösung (Perm/Wash-Puffer, BD Pharmingen) und die Zugabe von 50 µL Antikörper, Isotypkontrolle bzw. Negativkontrolle in entsprechender Verdünnung (Tab. 2). Die Verdünnungen wurden mit saponinhaltiger Waschlösung durchgeführt, um die Durchlässigkeit der

Zellmembran während der 30 minütigen Inkubation (4 °C, im Dunkeln) aufrecht zu erhalten. Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von 50µL saponinhaltige Waschlösung, die Zentrifugation (1200 rpm, 4 min) und zwei weitere Waschschrirte mit 100µL saponinhaltiger Waschlösung. Zuletzt wurden die Zellen in 200µL FACS-Puffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Es folgte die Messung und Auswertung der Daten (s. Kap.2.2.3.4 Messung und Auswertung der Daten S. 29 f).

Antikörper/Isotyp	Verdünnung für membrangebundenes FACS	Verdünnung für intrazelluläres FACS	Firma
BAFF (FITC)	---	1:10	R&D Systems, WI-Nordenstadt, D
BAFF (FITC)	1:50	---	Acris Antibodies, San Diego, USA
BAFF (FITC)	1:75	---	Axxora, Lörrach, D
BAFF (Atto-488)	1:75	1:75	Axxora, Lörrach, D
CD-14 (PerCP-CY5.5)	1:20	1:20	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Isotyp (Atto-488)	1:75	1:75	Axxora, Lörrach, D
Isotyp (FITC)	---	1:10	R&D Systems, WI-Nordenstadt, D
Isotyp (FITC)	1:50	---	Acris Antibodies, San Diego, USA
Isotyp (FITC)	1:375	---	Southern Biotech, Birmingham, USA
Isotyp (PerCP-CY5.5)	1:20	1:20	BD Pharmingen, Heidelberg, D

**Tab. 2: Für die Durchflusszytometrie verwendete Antikörper und Isotypen und deren Verdünnungen**

#### **2.2.3.4 Messung und Auswertung der Daten**

Bis zur Messung, die direkt nach der Versuchsdurchführung stattfand, wurden die Proben im Dunkeln bei 4 °C gelagert. Kurz vor der Messung am Durchflusszytometer wurden die Proben mit einem Vortexer durchmischt um eine heterogene Zellsuspension zu erhalten. Am Durchflusszytometer wurden sodann mit Hilfe der Cellquest Software die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Proben gemessen, pro Probe wurden 10000 Ereignisse erfasst. Die weitere Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms WinMDI. Für die Analyse der Fluoreszenzintensitäten wurden nur Ereignisse intakter Zellen berücksichtigt. Dazu wurde ein Analysenfenster (Gate) um die entsprechende Population erstellt, von dem die geometrisch gemittelten Fluoreszenzintensitäten (GMean) einer jeden Probe durch die Software errechnet wurden. Da die Fluoreszenzintensität des Isotypen die unspezifischen Bindungen aufzeigen, wurden diese von der des Antikörpers abgezogen und somit der Delta-GMean (dGMean) erhalten.

#### **2.2.4 Enzymgekoppeltes Immunoassay (ELISA)**

ELISA bezeichnet ein Verfahren, das mit Hilfe von enzymgekoppelten Antikörpern quantitativ Moleküle nachweisen kann. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Sandwich-ELISA angewendet. Das Prinzip des Sandwich-ELISA beruht auf zwei Antikörpern, die für zwei verschiedene Epitope des Antigens spezifisch sind. Ein Fangantikörper ist fest mit der Mikrotiterplatte verbunden. Nach Zugabe der Probe bindet dieser Antikörper das zu bestimmende Antigen. Anschließend erfolgen Waschschriffe, um unspezifische Bindungen zu vermeiden und somit ein falsch positives Ergebnis zu verhindern. Im Anschluss wird ein Detektionsantikörper hinzugegeben, der an das Enzym Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase = HRP) gebunden ist. Nach mehreren Waschschriffen wird das passende chromogene Substrat Tetramethylbenzidin hinzugefügt. Dies führt zu einer messbaren Farbreaktion. Diese wird durch eine Stopplösung z.B. Schwefelsäure beendet und die Absorption mit einem Photometer gemessen. Die sich entwickelnde Farbreaktion ist proportional zu der Antigen-Menge in den einzelnen Vertiefungen. Mittels der geräteeigenen Software wird unter Verwendung von Proteinstandards die Konzentration der Proben errechnet.

Zur Bestimmung der Konzentration von löslichem BAFF in den Zellkulturüberständen wurde ein kommerziell erhältliches ELISA Kit (Quantikine human BAFF/Blys)

verwendet, die Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll. Zunächst wurden die Zellüberstände aufgetaut und wie alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht. Der Waschpuffer und die BAFF-Standardreihe wurden nach Herstellerangaben vorbereitet. In jede Vertiefung wurden 100  $\mu\text{L}$  Assay Diluent RD 1-72 sowie 75  $\mu\text{L}$  Zellkulturüberstand, Kontrolle oder Standard pipettiert und dann im Dunkeln 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. In diesem ersten Inkubationsschritt bindet der Fangantikörper, der an der Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden ist, die löslichen BAFF-Moleküle. Nach vier Waschschrritten mit je 400  $\mu\text{L}$  Waschpuffer, wurden pro Vertiefung 200  $\mu\text{L}$  BAFF/Blys-Konjugat hinzugefügt. In diesem zweiten Inkubationsschritt bindet der HRP anti-BAFF-Antikörper an das an dem Fangantikörper gebundene BAFF-Molekül. Nach einer zweistündigen Inkubation wurden wiederum vier Waschschrritte mit je 400  $\mu\text{L}$  Waschpuffer durchgeführt. Anschließend wurden 200  $\mu\text{L}$  Substratlösung hinzugefügt und 20 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Die Substratlösung wurde frisch zubereitet und setzte sich aus  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Tetramethylbenzidin zusammen. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  2N Schwefelsäure beendet. Die Absorptionsmessung erfolgte innerhalb der nächsten 30 Minuten mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm. Zusätzlich wurde eine Messung bei der Referenzwellenlänge von 540 nm durchgeführt. Mit Hilfe der Ascent-Software wurde eine Standardkurve erstellt, anhand welcher die Konzentration des löslichen BAFF in den Kulturüberständen ermittelt werden konnte.

### 2.2.5 Statistik

Die Daten wurden mit Hilfe der Software Graphpad Prism (Version 4) statistisch ausgewertet. Zur Varianzanalyse wurde der Two-Way ANOVA-Test mit anschließendem Bonferroni post-hoc-Test durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 5 % definiert, das heißt ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als signifikant erachtet.

## 3. Ergebnisse

### ***3.1 Wirkung von Immunsuppressiva auf die Viabilität von Monozyten***

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht ob die Immunsuppressiva Rapamycin, Cyclosporin A, Methotrexat und Mycophenolatmofetil sowie der Immunmodulator Valproinsäure einen Einfluss auf die BAFF-Expression und Freisetzung in Monozyten haben und sich dadurch neue Wirkmechanismen dieser Medikamente identifizieren lassen.

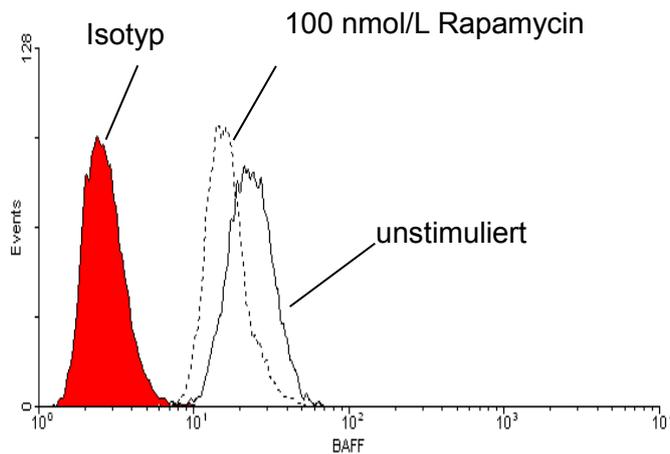
Damit ausgeschlossen werden konnte, dass Veränderungen der intrazellulären und membrangebundenen BAFF-Expression sowie der Freisetzung auf einer Abnahme der Zellviabilität beruhen, wurde ein WST-Assay durchgeführt. Mit einem WST-Assay lässt sich die Anzahl metabolisch aktiver Zellen in einer Probe bestimmen, zytotoxische Effekte der Immunsuppressiva können dadurch aufgezeigt werden. Zur Bestimmung der Zellviabilität wurden U937-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der Immunsuppressiva (Rapamycin: 2, 10, 20 und 100 nmol/L; Cyclosporin A: 2, 20, 200 und 2000 nmol/L; Methotrexat: 0,1, 1, 10 und 100 nmol/L, 1 und 10 µmol/L; Valproinsäure: 5, 10, 50, 100, 500 und 1000 µmol/L; Mycophenolatmofetil: 0,1, 1, 10 und 100 nmol/L, 1 und 10 µmol/L) für 24, 48 und 72 h stimuliert und anschließend mittels WST-Assay die Zellviabilität ermittelt. Die verwendeten Konzentrationen der Immunsuppressiva Rapamycin, Cyclosporin A und Valproinsäure zeigten keine zytotoxische Wirkung auf U937-Zellen (s. Anhang, Abb. 23-27, S.86 f). Eine Reduktion der Zellviabilität verglichen mit unstimulierten Zellen war durch Zugabe von 100 nmol/L, 1 und 10 µmol/L Methotrexat nach 48 und 72 h Stimulationszeit nachweisbar (s. Anhang, Abb. 26, S.87). Für die weiteren Experimente wurden infolgedessen die für Monozyten nicht zytotoxischen Methotrexat-Konzentrationen 0, 1, 1, und 10 nmol/L Methotrexat eingesetzt. Außerdem zeigte sich eine Reduktion der Anzahl metabolisch aktiver Zellen durch Zugabe von 1 und 10 µmol/L Mycophenolatmofetil verglichen mit unstimulierten Zellen nach einer Inkubation von 48 und 72 h. Für die nachfolgenden Versuche zur Expression und Sekretion von BAFF wurden daher die Konzentrationen 0, 1, 1, 10 und 100 nmol/L Mycophenolatmofetil verwendet (s. Anhang, Abb. 27, S. 88).

## **3.2 Einfluss von Immunsuppressiva auf die intrazelluläre Expression des B-Zell aktivierenden Faktor (BAFF) in Monozyten**

Da U937-Zellen eine hohe konstitutive BAFF-Expression aufweisen, wurde diese monozytäre Zelllinie als Modell für die Expressions- und Sekretionsuntersuchungen gewählt. Um Effekte aufgrund von Zytotoxizität zu vermeiden, wurden die Konzentrationen der Stimuli so gewählt, dass sie zu keiner Reduktion der Zellviabilität führten (s. Ergebnisse, S. 31 f). Nach der Stimulation mit den jeweiligen Immunsuppressiva wurden die Zellen geerntet und nach dem Standardprotokoll der Markierung intrazellulärer Proteine aufgearbeitet. Für die Experimente mit Cyclosporin A erfolgte die Markierung von intrazellulärem BAFF mit dem Antikörper BAFF Atto-488 der Firma Axxora, Lörrach, D. Für die Markierung von intrazellulärem BAFF nach Stimulation mit Rapamycin, Methotrexat, Valproinsäure und Mycophenolatmofetil kam der Antikörper BAFF (FITC) der Firma R&D Systems, WI-Nordenstadt, D zum Einsatz. Die Markierung von CD14 erfolgte für alle Immunsuppressiva mit dem Antikörper anti-CD14-PerCP-CY5.5 der Firma BD Pharmingen, Heidelberg, D. Anschließend wurden die Proben mittels Durchflusszytometrie gemessen und ausgewertet. Sofern nicht anders vermerkt sind die dargestellten Ergebnisse Mittelwerte aus Duplikaten aus einem Versuch, die in einem weiteren unabhängigen Versuch reproduziert wurden.

### **3.2.1 Rapamycin reguliert die Expression von intrazellulärem BAFF in Monozyten herunter**

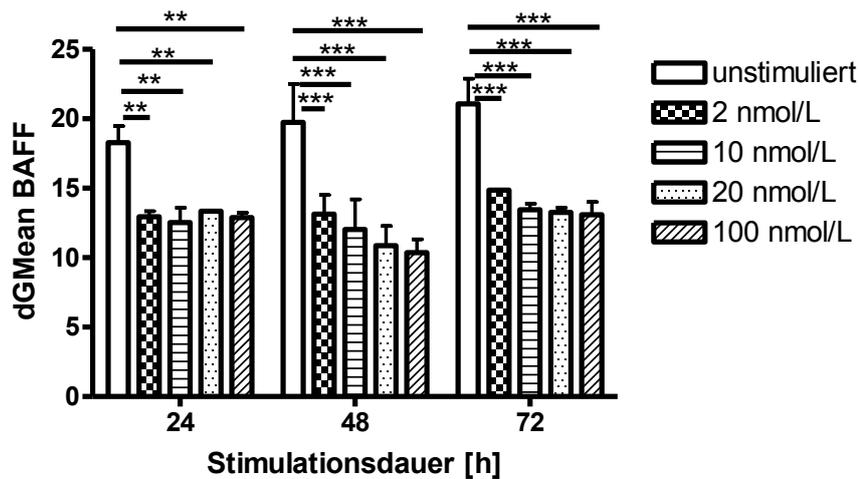
Nachfolgend ist beispielhaft ein Histogramm dargestellt, welches die Fluoreszenzintensitäten eines Stimulationsversuches mit 100 nmol/L Rapamycin nach 48 h zeigt. Die Fluoreszenzintensitätskurve der Isotypkontrolle liegt im negativen Fluoreszenzbereich (zwischen  $10^0$  und  $10^1$ ), die Fluoreszenzintensitätskurve der unstimulierten Zellen liegt im positiven Bereich d. h. größer als  $10^1$ . Die Probe mit Rapamycin-behandelten Zellen zeigte eine Linksverschiebung der Kurve, verglichen mit den unstimulierten Zellen, und somit eine Abnahme der Fluoreszenzintensität (Abb. 7).



**Abb 7.: Beispielhaftes Histogramm zur Darstellung der Fluoreszenzintensitäten nach Stimulation mit Rapamycin.**

Links ist die Kurve der Isotypkontrolle (rot), die das Ausmaß der Hintergrundfluoreszenz darstellt, zwischen  $10^0$  und  $10^1$  abgebildet. Rechts im Histogramm ist die Kurve der unstimulierten Zellen dargestellt (durchgezogene Linie). 100 nmol/L Rapamycin führen nach 48 h zu einer Abnahme der intrazellulären BAFF-Expression (gestrichelte Linie).

U937-Zellen wurden mit vier Konzentrationen Rapamycin, 2, 10, 20 und 100 nmol/L für 24, 48 und 72 h stimuliert. Nach der Zellernte wurde die intrazelluläre BAFF-Expression mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Inkubation mit Rapamycin führte zu einer signifikanten Abnahme der intrazellulären BAFF-Expression. Die Reduktion der Expression ließ sich bereits nach 24 h detektieren (dGMean, unstimuliert:  $18,28 \pm 1,2$ ; 2 nmol/L:  $12,95 \pm 0,4$ ; 10 nmol/L:  $12,54 \pm 1,0$ ; 20 nmol/L:  $13,35 \pm 0,05$ ; 100 nmol/L:  $12,88 \pm 0,4$ ; Abb. 10). Nach 48 und 72 h war ebenso eine signifikante Reduktion der Expression nachweisbar, mit einem Maximum nach 48 h. Nach 48 und 72 h war eine Tendenz zur Konzentrationsabhängigkeit zu erkennen, die Konzentrationsabhängigkeit war nicht signifikant (dGMean, 48 h unstimuliert,  $19,74 \pm 2,7$ ; 2 nmol/L:  $13,14 \pm 1,4$ ; 10 nmol/L:  $12,03 \pm 2,2$ ; 20 nmol/L:  $10,87 \pm 1,4$ ; 100 nmol/L:  $0,36 \pm 1,0$ ; 72 h unstimuliert:  $21,07 \pm 1,8$ ; 2 nmol/L:  $14,86 \pm 0,0$ ; 10 nmol/L:  $13,45 \pm 0,4$ ; 20 nmol/L:  $13,26 \pm 0,33$ ; 100 nmol/L  $13,09 \pm 0,93$ ; Abb. 8).



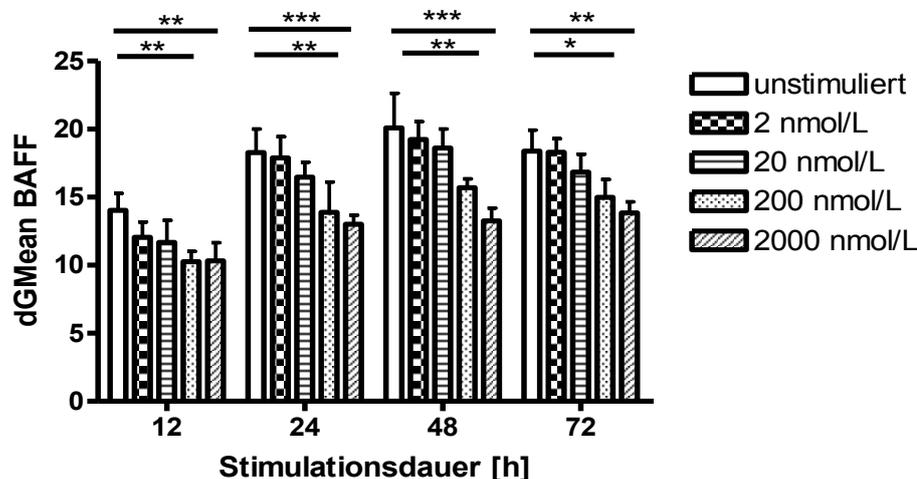
**Abb. 8: Abnahme der intrazellulären BAFF-Expression in Monozyten nach Stimulation mit Rapamycin.**

U937-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit 2 (kariert), 10 (liniert), 20 (gepunktet) und 100 nmol/L (schraffiert) Rapamycin stimuliert (n = 2). Die Analyse der intrazellulären BAFF-Expression erfolgte mit Hilfe eines Durchflusszytometers. Rapamycin führte, verglichen mit unstimulierten Zellen (leer), nach 24, 48 und 72 h zu einer signifikanten Abnahme der intrazellulären BAFF-Expression. Nach allen drei Stimulationszeiträumen war dieser Effekt detektierbar. Die kleinen Balken zeigen die Standardabweichung (SD) an. \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001

### 3.2.2 Cyclosporin A führt zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der intrazellulären BAFF-Expression in Monozyten

Nach der Stimulation für 12, 24, 48 und 72 h mit 2, 20, 200 und 2000 nmol/L Cyclosporin A wurde die intrazelluläre BAFF-Expression in U937-Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen. Verglichen mit unstimulierten Zellen kam es zu einer signifikanten Abnahme der intrazellulären BAFF-Expression nach allen vier Stimulationszeiträumen mit einem Maximum nach 48 h. Die Abnahme war konzentrationsabhängig. 2000 nmol/L zeigte den stärksten Effekt, aber bereits bei einer Konzentration von 200 nmol/L führte Cyclosporin A zu einer signifikanten Abnahme der intrazellulären Expression von BAFF (dGmean: 12 h unstimuliert: 14,03 ± 1,3; 2 nmol/L: 12,06 ± 1,1; 20 nmol/L: 11,68 ± 1,6; 200 nmol/L: 10,26 ± 0,7; 2000 nmol/L: 10,33 ± 1,3; 24h unstimuliert: 18,28 ± 1,7; 2 nmol/L: 17,88 ± 1,6; 20 nmol/L: 16,48 ± 1,1; 200 nmol/L: 13,88 ± 2,2; 2000 nmol/L: 13,01 ± 0,6; 48 h unstimuliert: 20,10 ± 2,53; 2 nmol/L: 19,24 ± 1,3; 20 nmol/L 18,61 ± 1,39; 200 nmol/L: 15,86 ± 0,65; 2000 nmol/L

13,25 ± 0,94; 72h unstimuliert: 18,38 ± 1,53, 2 nmol/L: 18,31 ± 0,99; 20 nmol/L: 16,84 ± 1,31; 200 nmol/L: 14,98 ± 1,31; 2000 nmol/L: 13,84 ± 0,82; Abb. 9). Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus Triplikaten eines einzelnen Versuchs. Sie wurden in zwei weiteren unabhängigen Versuchen reproduziert.



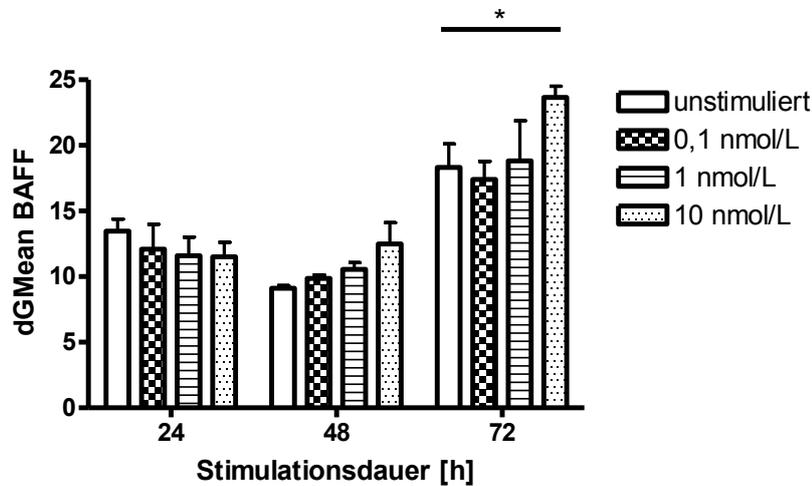
**Abb. 9: Herunterregulierung der intrazellulären BAFF-Expression in Monozyten durch Cyclosporin A.**

U937-Zellen wurden mit 2 (kariert), 20 (liniert), 200 (gepunktet), und 2000 nmol/L (schraffiert) Cyclosporin A für 12, 24, 48 und 72 h stimuliert (n = 3). Anschließend wurde mit einem Durchflusszytometer die intrazelluläre BAFF-Expression gemessen. Cyclosporin A resultierte in einer signifikanten Abnahme der intrazellulären BAFF-Expression verglichen mit unstimulierten Zellen (leer) nach 12, 24, 48 und 72 h. Die Herabsetzung war konzentrationsabhängig. Signifikanzen, die zwischen den einzelnen Konzentrationen bestanden, wurden hier nicht dargestellt. Die Standardabweichungen (SD) sind als kleine Balken dargestellt. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001

### 3.2.3 Methotrexat bewirkt einen Anstieg der intrazellulären BAFF-Expression

Die Bestimmung der intrazellulären BAFF-Expression nach der Stimulation von U937-Zellen mit 0,1, 1 und 10 nmol/L Methotrexat für 24, 48 und 72 h erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Verglichen mit den Referenzzellen (= unstimuliert) bewirkte 10 nmol/L Methotrexat eine signifikante Zunahme der intrazellulären BAFF-Expression nach 72 h (dGMean: unstimuliert: 18,33 ± 1,8; 0,1 nmol/L: 17,42 ± 1,4; 1 nmol/L: 18,81 ± 3,0; 10 nmol/L: 23,66 ± 0,8; Abb. 11). Nach 48 h zeigte sich bereits eine Tendenz der konzentrationsabhängigen Zunahme der intrazellulären BAFF-Expression (dGMean: unstimuliert: 9,11 ± 0,2; 0,1 nmol/L: 9,87 ± 0,27; 1 nmol/L: 10,55 ± 0,53; 10 nmol/L: 12,49 ± 1,61; Abb. 10). Eine 24stündige Inkubation mit Methotrexat zeigte eine nicht

signifikante Abnahme der intrazellulären BAFF-Expression (dGMean: unstimuliert:  $13,47 \pm 0,9$ ; 0,1 nmol/L:  $12,1 \pm 1,8$ , 1 nmol/L:  $11,60 \pm 1,4$ ; 10 nmol/L:  $11,51 \pm 1,1$ ; Abb. 11).

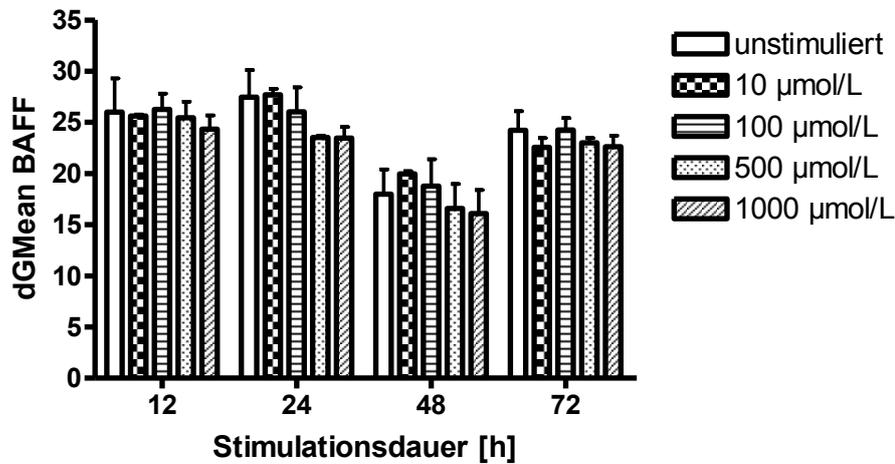


**Abb. 10: Regulierung der intrazellulären BAFF-Expression in Monozyten nach Stimulation mit Methotrexat nach 24, 48 und 72h.**

U937-Zellen wurden mit 0,1 (kariert), 1 (liniert) und 10 nmol/L (gepunktet) Methotrexat für 24, 48, und 72 h stimuliert (n = 2). Die intrazelluläre Expression von BAFF wurde mit Hilfe eines Durchflusszytometers analysiert. 10 nmol/L Methotrexat führte zu einer signifikanten Zunahme der intrazellulären BAFF-Expression nach 72 h verglichen mit unstimulierten Zellen (leer). Nach 24 und 48 h war kein signifikanter Effekt durch Methotrexat detektierbar, jedoch zeigte sich nach 48 h bereits eine Tendenz zur Zunahme der Expression von intrazellulärem BAFF. Die kleinen Balken stellen die Standardabweichung (SD) dar. \* =  $p < 0,05$

### 3.2.4 Valproinsäure hat keinen signifikanten Effekt auf die intrazelluläre BAFF-Expression in Monozyten

Es wurden U937-Zellen mit 10, 100, 500 und 1000  $\mu\text{mol/L}$  Valproinsäure für 12, 24, 48, und 72 h stimuliert. Nach der Zellernte wurde die intrazelluläre Expression von BAFF mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Zu allen Zeitpunkten ließ sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der intrazellulären BAFF-Expression detektieren (dGMean: 12 h unstimuliert:  $26 \pm 3,3$ ; 10  $\mu\text{mol/L}$ :  $25,63 \pm 0,2$ ; 100  $\mu\text{mol/L}$ :  $25,25 \pm 1,6$ ; 500  $\mu\text{mol/L}$ :  $25,45 \pm 1,6$ ; 1000  $\mu\text{mol/L}$ :  $24,33 \pm 1,4$ ; 24 h unstimuliert:  $27,46 \pm 2,6$ ; 10  $\mu\text{mol/L}$ :  $27,68 \pm 0,58$ ; 100  $\mu\text{mol/L}$ :  $26,04 \pm 2,4$ ; 500  $\mu\text{mol/L}$ :  $23,52 \pm 0,18$ ; 1000  $\mu\text{mol/L}$ :  $23,48 \pm 1,08$ ; 48 h unstimuliert:  $17,97 \pm 2,44$ ; 10  $\mu\text{mol/L}$ :  $19,97 \pm 0,26$ ; 100  $\mu\text{mol/L}$ :  $18,77 \pm 2,63$ ; 500  $\mu\text{mol/L}$ :  $16,57 \pm 2,4$ ; 1000  $\mu\text{mol/L}$ :  $16,09 \pm 2,29$ ; 72 h unstimuliert:  $24,22 \pm 1,8$ ; 10  $\mu\text{mol/L}$ :  $22,55 \pm 0,9$ ; 100  $\mu\text{mol/L}$ :  $24,255 \pm 1,2$ ; 500  $\mu\text{mol/L}$ :  $22,98 \pm 0,46$ ; 1000  $\mu\text{mol/L}$ :  $22,62 \pm 1,08$ , Abb. 11). Eine signifikante Herunterregulierung war jedoch zu keinem Zeitraum nachweisbar.

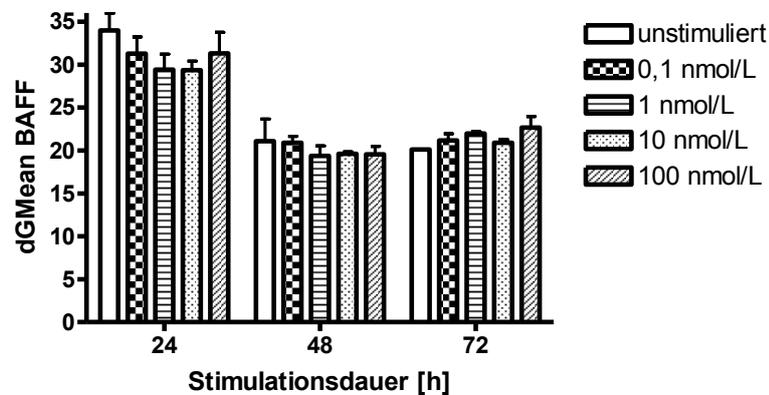


**Abb. 11: Valproinsäure resultiert in einer Abnahme der intrazellulären BAFF-Konzentration in Monozyten.**

U937-Zellen wurden mit 10 (kariert), 100 (liniert), 500 (gepunktet) und 1000 µmol/L (schraffiert) Valproinsäure für 12, 24, 48, und 72 h stimuliert (n = 2). Die Messung der intrazellulären BAFF-Expression erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Valproinsäure führte zu einer nicht signifikanten Reduzierung der intrazellulären BAFF-Expression. Die Herunterregulierung war konzentrationsabhängig. Die dünnen Balken zeigen die Standardabweichung (SD) an.

### 3.2.5 Mycophenolatmofetil hat keinen Einfluss auf die Expression von intrazellulärem BAFF in Monozyten

U937-Zellen wurde für 24, 48 und 72 h mit 0,1, 1, 10 und 100 nmol/L Mycophenolatmofetil stimuliert und anschließend die intrazelluläre BAFF-Expression mittels Durchflusszytometrie gemessen (s. Methoden, S. 21 f). Zu keinem Zeitraum konnte eine signifikante reproduzierbare Änderung der BAFF-Expression nachgewiesen werden (dGMean: 24 h unstimuliert:  $33,97 \pm 2,0$ ; 0,1 nmol/L:  $31,29 \pm 2,7$ ; 1 nmol/L:  $29,42 \pm 2,5$ ; 10 nmol/L:  $29,36 \pm 1,5$ ; 100 nmol/L:  $31,30 \pm 3,5$ ; 48 h unstimuliert:  $21,08 \pm 2,6$ ; 0,1 nmol/L:  $20,9 \pm 1,0$ ; 1 nmol/L:  $19,37 \pm 1,6$ ; 10 nmol/L:  $19,61 \pm 0,3$ ; 100 nmol/L:  $19,54 \pm 1,3$ ; 72 h unstimuliert:  $20,1 \pm 0$ ; 0,1 nmol/L:  $21,18 \pm 1,08$ ; 1 nmol/L:  $21,97 \pm 0,28$ ; 10 nmol/L:  $20,89 \pm 0,6$ ; 100 nmol/L:  $22,67 \pm 1,8$ , Abb. 12).



**Abb. 12: Die intrazelluläre BAFF-Expression wird durch Mycophenolatmofetil in Monozyten nicht beeinflusst.**

Monozyten der Zelllinie U937 wurden mit 0,1 (kariert), 1 (liniert), 10 (gepunktet) und 100 nmol/L (schraffiert) Mycophenolatmofetil für 24, 48, und 72 h stimuliert ( $n = 2$ ). Nach der Zellernte wurden die Zellen aufgearbeitet und die intrazelluläre BAFF-Expression mittels FACS gemessen. Mycophenolatmofetil führte nach keinem Stimulationszeitraum und durch keine der verwendeten Konzentrationen zu einer Änderung der intrazellulären BAFF-Expression. Die Standardabweichung (SD) wird durch die kleinen Balken dargestellt.

### 3.2.6 Übersicht über die Ergebnisse der Experimente zur Wirkung von Immunsuppressiva auf die intrazelluläre BAFF-Expression

Zusammenfassend konnte mit diesen Versuchen nachgewiesen werden, dass Rapamycin und Cyclosporin A in einer signifikanten Abnahme der intrazellulären BAFF-Expression in U937-Zellen resultieren. Die Herunterregulierung durch Cyclosporin A war stark konzentrationsabhängig mit einem Maximum nach 48 h. Rapamycin wies eine signifikante Abnahme nach allen drei Zeiträumen auf, nach 48 und 72 h war eine Tendenz zur Konzentrationsabhängigkeit nachweisbar. Methotrexat bewirkte eine Zunahme der Expression von intrazellulärem BAFF nach 72 h. Valproinsäure und Mycophenolatmofetil zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die intrazelluläre BAFF-Expression (Tab. 3).

Immunsuppressivum	Stimulationsdauer [h]	Konzentration des Stimulus	Wert [dGMean]	Signifikanzniveau	Abnahme (-) Zunahme (+) [%]
Rapamycin	48	unstimuliert	19,74	---	---
		2 nmol/L	13,14	---	33,34(-)
		20 nmol/L	10,87	p < 0,01	44,93(-)
		100 nmol/L	10,36	p < 0,001	47,51(-)
Cyclosporin A	48	unstimuliert	20,1	---	---
		20 nmol/L	18,61	---	7,41
		200 nmol/L	15,68	p < 0,01	21,99
		2000 nmol/L	13,25	p < 0,001	34,01
Methotrexat	72	unstimuliert	18,33	---	---
		1 nmol/L	18,81	---	2,61(+)
		10 nmol/L	23,66	p < 0,05	20,01(+)
Valproinsäure	24	unstimuliert	27,46	---	---
		100 µmol/L	26,04	---	0,51(-)
		500 µmol/L	23,52	---	1,43(-)
		1000 µmol/L	23,48	---	1,44(-)
Mycophenolat mofetil	48	Unstimuliert	21,08	---	---
		1 nmol/L	19,37	---	0,81(-)
		10 nmol/L	19,61	---	0,69(-)
		100 nmol/L	19,54	---	0,73(-)

**Tab. 3: Wirkung von Immunsuppressiva auf die intrazelluläre BAFF-Expression,- Übersicht der Resultate**

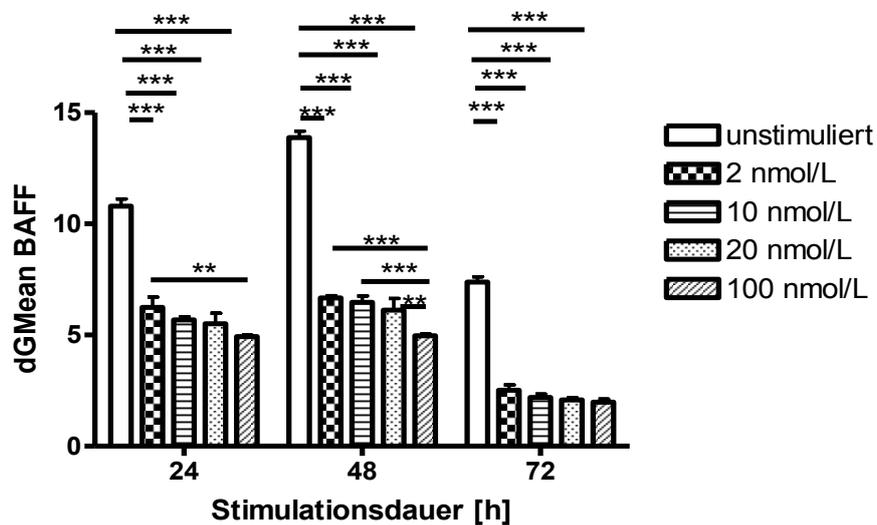
### **3.3 Einfluss von Immunsuppressiva auf die Expression des membrangebundenen B-Zell aktivierenden Faktors (BAFF) in Monozyten**

Zur Untersuchung des Einflusses der in dieser Arbeit verwendeten Immunsuppressiva

auf die Expression von membrangebundenem BAFF wurde die Zelllinie U937 verwendet, da sie eine relativ hohe basale Expression aufweist. Die Konzentrationen der Immunsuppressiva wurden mittels WST-Assay auf ihre Toxizität hin geprüft und anschließend entsprechend gewählt. Eine Abnahme der membrangebundenen BAFF-Expression durch eine Reduktion der metabolisch aktiven Zellen konnte dadurch ausgeschlossen werden. Die Zellen wurden geerntet und nach dem Standardprotokoll zur Markierung membranständiger Proteine aufgearbeitet. CD-14 wurde in allen Expressionsversuchen mit dem Antikörper anti-CD-14-PerCP-CY5.5 der Firma BD Pharmingen, Heidelberg, D markiert. Die Markierung von membrangebundenem BAFF erfolgte nach Stimulation mit Rapamycin, Methotrexat und Valproinsäure durch den Antikörper BAFF (FITC) der Firma Acris Antibodies, San Diego, USA. Nach Stimulation mit Cyclosporin A wurde zur Proteinmarkierung der Antikörper BAFF (Atto-488) der Firma Axxora, Lörrach, D verwendet. Die Markierung von membrangebundenen BAFF für die Stimulationsversuche mit Mycophenolatmofetil erfolgte mit dem Antikörper BAFF (FITC) der Firma Axxora, Lörrach, D. Mittels Durchflusszytometrie wurden die Proben gemessen. Falls nicht anders markiert sind die Ergebnisse Mittelwerte aus Duplikaten aus einem Versuch, die in einem weiteren unabhängigen Versuch reproduziert wurden.

### **3.3.1 Rapamycin reguliert die Expression von membranständigem BAFF in Monozyten herunter**

Es zeigte sich bereits eine signifikante Herunterregulierung der intrazellulären BAFF-Expression in Monozyten durch Rapamycin. Zudem wurde dessen Wirkung auf die membranständige BAFF-Expression untersucht. U937-Zellen wurden mit 2, 10, 20 und 100 nmol/L Rapamycin für 24, 48 und 72 h stimuliert und anschließend wurde mittels Durchflusszytometrie die membrangebundene BAFF-Expression gemessen. Eine signifikante Herabsetzung der BAFF-Expression auf der Zelloberfläche ließ sich nach allen drei Stimulationszeiträumen mit einem Maximum nach 48 h durch die verwendeten Rapamycin-Konzentrationen detektieren,- eine Konzentrationsabhängigkeit war zu erkennen (dGMean, 24h unstimuliert:  $10,80 \pm 0,31$ ; 2 nmol/L:  $6,24 \pm 0,4$ ; 10 nmol/L:  $5,86 \pm 0,13$ ; 20 nmol/L:  $5,5 \pm 0,48$ ; 100 nmol/L:  $4,94 \pm 0,06$ , 48 h unstimuliert  $13,89 \pm 0,28$ ; 2 nmol/L:  $6,65 \pm 0,1$ ; 10 nmol/L:  $6,47 \pm 0,29$ ; 20 nmol/L:  $6,12 \pm 0,5$ ; 100 nmol/L:  $4,97 \pm 0,07$ ; 72 h, unstimuliert:  $7,39 \pm 0,23$ ; 2 nmol/L  $2,52 \pm 0,24$ ; 10 nmol/L:  $2,19 \pm 0,16$ ; 20 nmol/L:  $2,08 \pm 0,1$ ; 100 nmol/L:  $1,99 \pm 0,13$ ; Abb. 13).



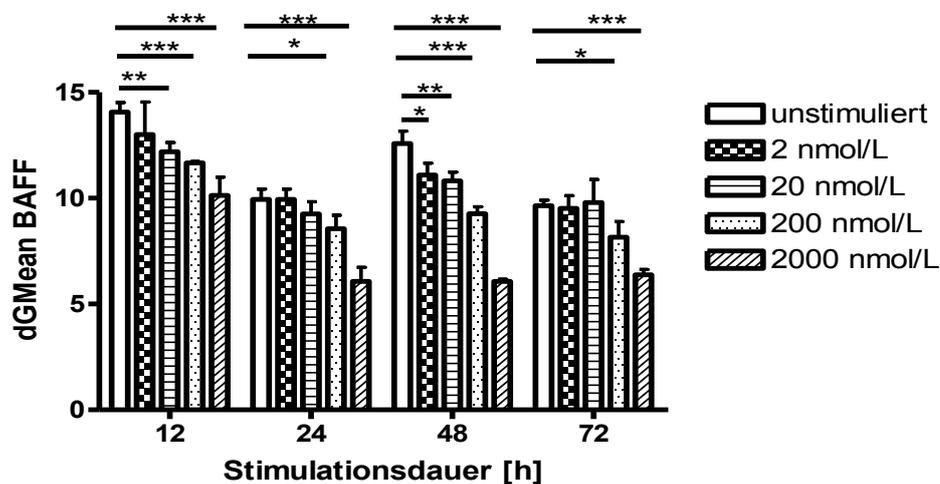
**Abb. 13: Rapamycin führte in Monozyten zu einer Herabsetzung der membrangebundenen BAFF-Expression.**

U937-Zellen wurden mit 2 (kariert), 10 (liniert) 20 (gepunktet) und 100 nmol/L (schraffiert) Rapamycin für 24, 48, und 72 h stimuliert (n = 2). Die Analyse der membrangebundenen BAFF-Expression erfolgte mittels FACS. Rapamycin führte nach allen Stimulationszeiträumen zu einer signifikanten Abnahme der membrangebundenen BAFF-Expression. Die Abnahme war konzentrationsabhängig. Signifikanzen zwischen den einzelnen Konzentrationen bestanden, wurden hier aber nicht dargestellt. Die kleinen Balken stellen die Standardabweichung (SD) dar. \*\*\* = p < 0,001

### 3.3.2 Cyclosporin A führt zu einer konzentrationsabhängigen Herunterregulierung der membranständigen BAFF-Expression in Monozyten

Nachdem eine konzentrationsabhängige Abnahme der intrazellulären BAFF-Expression durch Cyclosporin A detektiert werden konnte, wurde weiterhin die Wirkung von Cyclosporin A auf die Expression von BAFF auf der Zelloberfläche untersucht. U937-Zellen wurden für 12, 24, 48 und 72 h mit 2, 20, 200 und 2000 nmol/L Cyclosporin A stimuliert und die Expression membranständiger Proteine mittels Durchflusszytometrie gemessen. Nach allen Stimulationszeiträumen ließ sich eine signifikante Herunterregulierung der Expression von membranständigem BAFF durch Zugabe von 200 nmol/L und 2000 nmol/L Cyclosporin A detektieren. Die Abnahme war

konzentrationsabhängig. Das Maximum der Reduktion war nach 48 h nachweisbar (dGMean 12h unstimuliert:  $14,07 \pm 0,45$ ; 2 nmol/L:  $13,01 \pm 1,5$ ; 20 nmol/L:  $12,2 \pm 0,43$ ; 200 nmol/L:  $11,67 \pm 0,06$ ; 2000 nmol/L:  $10,13 \pm 0,86$ ; 24 h unstimuliert:  $9,94 \pm 0,48$ ; 2 nmol/L:  $9,94 \pm 0,5$ ; 20 nmol/L:  $9,25 \pm 0,6$ ; 200 nmol/L:  $8,55 \pm 0,6$ ; 2000 nmol/L:  $6,06 \pm 0,66$ ; 48 h unstimuliert:  $12,59 \pm 0,58$ ; 2 nmol/L:  $11,09 \pm 0,56$ ; 20 nmol/L:  $10,82 \pm 0,41$ ; 200 nmol/L:  $9,27 \pm 0,32$ ; 2000 nmol/L:  $6,07 \pm 0,09$ ; 72 h unstimuliert:  $9,64 \pm 0,27$ ; 2 nmol/L:  $9,51 \pm 0,59$ ; 20 nmol/L:  $9,80 \pm 1,08$ ; 200 nmol/L:  $8,16 \pm 0,72$ ; 2000 nmol/L:  $6,37 \pm 0,25$ ; Abb. 14). Dargestellt sind die Ergebnisse von Mittelwerten aus Triplikaten einzelner Versuche, die in zwei weiteren unabhängigen Versuchen reproduziert wurden.



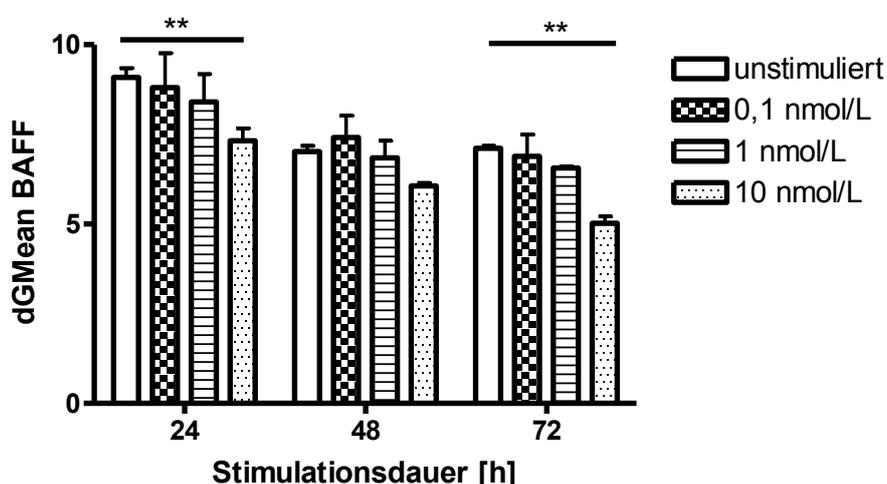
**Abb. 14: Abnahme der membranständigen BAFF-Expression in Monozyten durch Cyclosporin A.**

U937-Zellen wurden mit 2 (kariert), 20 (liniert), 200 (gepunktet) und 2000 nmol/L (schraffiert) Cyclosporin A für 12, 24, 48 und 72 h stimuliert (n = 3). Die membrangebundene BAFF-Expression wurde nach der Zellernte mittels Durchflusszytometrie gemessen. Cyclosporin A führte nach 12, 24, 48 und 72 h zu einer signifikanten Abnahme der membrangebundenen BAFF-Expression. Die Abnahme war konzentrationsabhängig. Signifikanzen zwischen den Konzentrationen bestanden, wurden hier aber nicht dargestellt. Die kleinen Balken stellen die Standardabweichung (SD) dar. \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01, \*\*\* = p < 0,001

### 3.3.3 Methotrexat reguliert die Expression von membranständigem BAFF in Monozyten herunter

Nach der Detektion der signifikanten Zunahme der intrazellulären BAFF-Expression nach 72 h durch 10 nmol/L Methotrexat wurde dessen Wirkung auf die BAFF-Expression auf der Oberfläche von Monozyten untersucht. U937-Zellen wurden mit 0,1,

1 und 10 nmol/L Methotrexat stimuliert und nach 24, 48 und 72stündiger Inkubation wurde die membrangebundene BAFF-Expression durchflusszytometrisch gemessen. Zu allen Zeitpunkten konnte eine konzentrationsabhängige Abnahme von BAFF auf der Zelloberfläche detektiert werden. Nach 24 sowie nach 72 h Inkubation ließ sich durch Zugabe von 10 nmol/L Methotrexat eine signifikante Herabsetzung der membrangebundenen BAFF-Expression feststellen (dGMean: 24 h unstimuliert:  $9,09 \pm 0,25$ ; 0,1 nmol/L:  $8,85 \pm 0,95$ ; 1 nmol/L:  $8,41 \pm 0,77$ ; 10 nmol/L:  $7,32 \pm 0,35$ ; 48 h unstimuliert:  $7,02 \pm 0,15$ ; 0,1 nmol/L:  $7,41 \pm 0,61$ ; 1 nmol/L:  $6,85 \pm 0,46$ ; 10 nmol/L:  $6,07 \pm 0,09$ ; 72 h unstimuliert:  $7,12 \pm 0,06$ ; 0,1 nmol/L:  $6,89 \pm 0,6$ ; 1 nmol/L:  $6,56 \pm 0,05$ , 10 nmol/L:  $5,02 \pm 0,19$ ; Abb. 15).

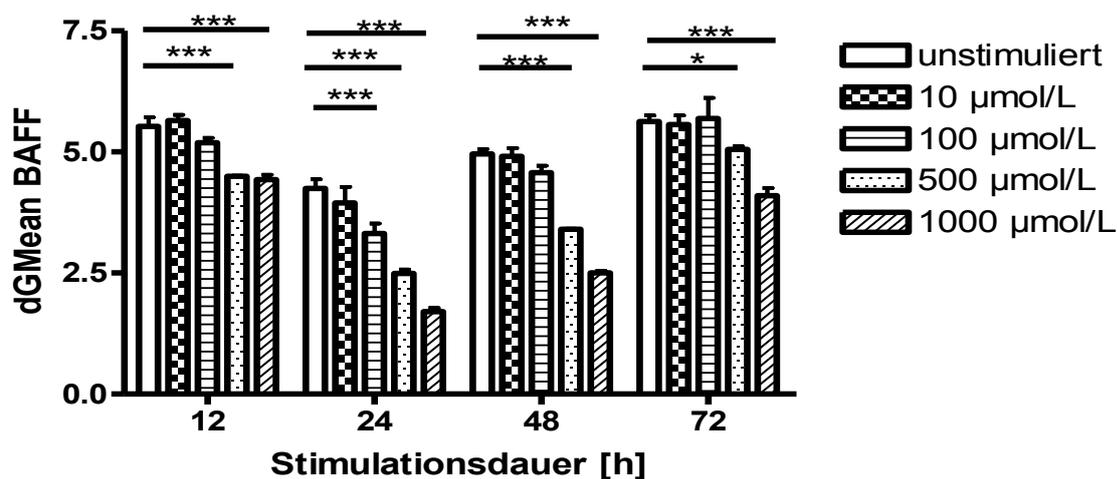


**Abb. 15: Verringerung der membranständigen BAFF-Expression durch Methotrexat.** U937-Zellen wurden mit 0,1 (kariert), 1 (liniert) und 10 nmol/L (gepunktet) Methotrexat für 24, 48, und 72 h stimuliert (n = 2). Mit Hilfe eines Durchflusszytometers wurde die membrangebundene BAFF-Expression analysiert. Nach 24- und 72stündiger Inkubation führte 10 nmol/L Methotrexat zu einer signifikanten Abnahme der membrangebundenen BAFF-Expression. Die kleinen Balken stellen die Standardabweichung (SD) dar. \*\* = p < 0,01

### 3.3.4 Valproinsäure reguliert die Expression von membranständigem BAFF in Monozyten herunter

Nachdem eine Abnahme der intrazellulären BAFF-Expression durch Valproinsäure festgestellt werden konnte, wurde dessen Wirkung auf die membrangebundene BAFF-Expression untersucht. Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen Valproinsäure, 10, 100, 500, und 1000  $\mu\text{mol/L}$  stimuliert und 12, 24, 48 und 72 h inkubiert. Danach erfolgte die Messung der membrangebundenen BAFF-Expression

mittels Durchflusszytometrie. Zu allen Zeitpunkten konnte eine signifikante Reduktion der membrangebundenen BAFF-Expression detektiert werden. Der Effekt war konzentrationsabhängig. Nach 12 h war dieser Effekt bereits nachweisbar (dGMean 12 h unstimuliert:  $5,53 \pm 0,18$ ; 10  $\mu\text{mol/L}$ :  $5,6 \pm 0,12$ ; 100  $\mu\text{mol/L}$ :  $5,19 \pm 0,99$ ; 500  $\mu\text{mol/L}$ :  $4,5 \pm 0,01$ ; 1000  $\mu\text{mol/L}$ :  $4,43 \pm 0,1$ ; Abb. 16). Das Maximum der Reduktion war nach 24 h detektierbar (dGMean 24 h unstimuliert:  $4,25 \pm 0,19$ ; 10  $\mu\text{mol/L}$ :  $3,95 \pm 0,33$ ; 100  $\mu\text{mol/L}$ :  $3,2 \pm 0,2$ ; 500  $\mu\text{mol/L}$ :  $2,49 \pm 0,08$ ; 1000  $\mu\text{mol/L}$ :  $1,7 \pm 0,07$ ; s. Abb. 16). Nach 48 h und 72 h konnte keine Steigerung des Effekts festgestellt werden (48 h unstimuliert:  $4,96 \pm 0,10$ ; 10  $\mu\text{mol/L}$ :  $4,91 \pm 0,16$ ; 100  $\mu\text{mol/L}$ :  $4,57 \pm 0,14$ ; 500  $\mu\text{mol/L}$ :  $3,4 \pm 0,01$ ; 1000  $\mu\text{mol/L}$ :  $2,51 \pm 0,04$ ; 72 h unstimuliert:  $5,62 \pm 0,12$ ; 10  $\mu\text{mol/L}$ :  $5,56 \pm 0,19$ ; 100  $\mu\text{mol/L}$ :  $5,69 \pm 0,42$ ; 500  $\mu\text{mol/L}$ :  $5,06 \pm 0,06$ ; 1000  $\mu\text{mol/L}$ :  $4,1 \pm 0,15$ ; Abb. 16)



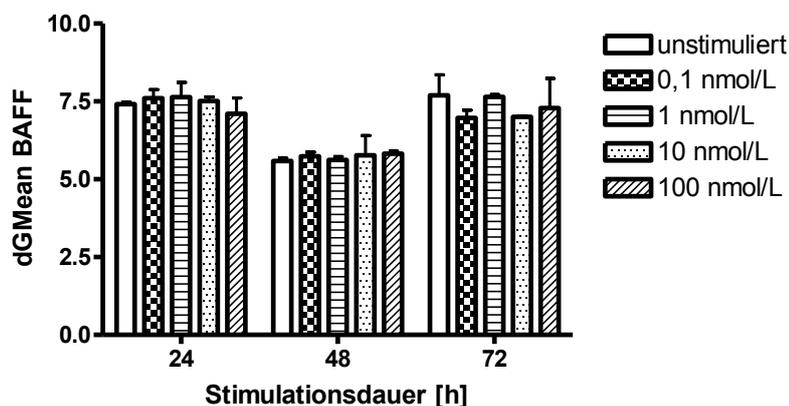
**Abb. 16: Valproinsäure resultiert in einer Herunterregulierung der membranständigen BAFF-Expression.**

Zellen der Linie U937 wurden mit 10 (kariert), 100 (liniert), 500 (gepunktet) und 1000  $\mu\text{mol/L}$  (schraffiert) stimuliert und nach der Inkubation (12, 24, 48 und 72 h) wurde die Oberflächenexpression von BAFF im Durchflusszytometer detektiert ( $n = 2$ ). Durch Valproinsäure konnte eine signifikante konzentrationsabhängige Reduktion der membrangebundenen BAFF-Expression nachgewiesen werden. Signifikanzen zwischen den einzelnen Konzentrationen bestanden, wurden hier aber nicht abgebildet. Die kleinen Balken stellen die Standardabweichung dar. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$

### 3.3.5 Mycophenolatmofetil hat keinen Einfluss auf die Expression von membranständigem BAFF in Monozyten

Um den Einfluss von Mycophenolatmofetil auf die membrangebundene BAFF-

Expression zu untersuchen, wurden U937-Zellen mit vier Konzentrationen 0,1, 1, 10 und 100 nmol/L für 24, 48 und 72 h Mycophenolatmofetil stimuliert und die Fluoreszenzintensitäten mittels Durchflusszytometrie gemessen (s. Methoden, S. 21 f). Zu keinem Zeitraum ließ sich eine Veränderung der BAFF-Konzentration an der Zelloberfläche aufzeigen (dGMean, 24 h unstimuliert:  $7,41 \pm 0,07$ ; 0,1 nmol/L:  $7,6 \pm 0,27$ ; 1 nmol/L:  $7,64 \pm 0,47$ , 10 nmol/L:  $7,51 \pm 0,12$ ; 100 nmol/L:  $7,1 \pm 0,5$ ; 48 h unstimuliert:  $5,59 \pm 0,09$ ; 0,1 nmol/L:  $5,74 \pm 0,13$ ; 1 nmol/L:  $5,62 \pm 0,11$ ; 10 nmol/L:  $5,77 \pm 0,6$ ; 100 nmol/L:  $5,82 \pm 0,08$ ; 72 h unstimuliert:  $7,7 \pm 0,65$ ; 0,1 nmol/L:  $6,97 \pm 0,25$ ; 1 nmol/L:  $7,65 \pm 0,07$ ; 10 nmol/L:  $7,01 \pm 0,02$ ; 100 nmol/L:  $7,29 \pm 0,95$ ; Abb. 18). Es konnte weder ein Einfluss von Mycophenolatmofetil auf die intrazelluläre noch auf die membranständige BAFF-Expression eruiert werden.



**Abb. 17: Mycophenolatmofetil zeigte keinen Effekt auf die membrangebundene BAFF-Expression in Monozyten.**

U937-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit 0,1 (kariert), 1 (liniert), 10 (gepunktet) und 100 nmol/L (schraffiert) Mycophenolatmofetil stimuliert und anschließend die membrangebundene BAFF-Expression mittels Durchflusszytometrie gemessen (n = 2). Im Vergleich zu unstimulierten Zellen (leer) konnte keine Veränderung der BAFF-Expression durch die verwendeten Konzentrationen detektiert werden. Die dünnen Balken zeigen die Standardabweichung (SD) an.

### 3.3.6 Übersicht über die Ergebnisse der Experimente zur Wirkung von Immunsuppressiva auf die membrangebundene BAFF-Expression

Zusammenfassend konnte mit diesen Expressionsuntersuchungen gezeigt werden dass Rapamycin, Cyclosporin A, Methotrexat und Valproinsäure zu einer signifikanten Herunterregulierung der BAFF-Expression auf der Zelloberfläche führen (Tab 4).

Valproinsäure und Cyclosporin A resultierten in einer stark konzentrationsabhängigen Abnahme der BAFF-Expression. Die Reduktion durch Rapamycin zeigte eine Tendenz zur Konzentrationsabhängigkeit. Mycophenolatmofetil zeigte keinen Einfluss auf die membranständige BAFF-Expression.

Immunsuppressivum	Stimulationsdauer [h]	Konzentration des Stimulus	Wert [dGMean]	Signifikanzniveau	Abnahme [%]
Rapamycin	48	unstimuliert	13,89	---	---
		2 nmol/L	6,67	p < 0,001	51,97
		20 nmol/L	6,12	p < 0,001	55,94
		100 nmol/L	4,97	p < 0,001	64,21
Cyclosporin A	48	unstimuliert	12,59	---	---
		20 nmol/L	10,82	p < 0,01	14,05
		200 nmol/L	9,27	p < 0,001	26,37
		2000 nmol/L	6,07	p < 0,001	51,79
Methotrexat	24	unstimuliert	9,09	---	---
		0,1 nmol/L	8,81	---	3,08
		1 nmol/L	8,41	---	7,48
		10 nmol/L	7,32	p < 0,01	19,47
Valproinsäure	48	unstimuliert	4,96	---	---
		100 µmol/L	4,57	---	7,86
		500 µmol/L	3,4	p < 0,001	31,45
		1000 µmol/L	2,51	p < 0,001	49,39
Mycophenolat mofetil	72	Unstimuliert	7,7	---	---
		1 nmol/L	7,65	---	0,07
		10 nmol/L	7,01	---	0,89
		100 nmol/L	7,29	---	0,53

**Tab. 4: Wirkung von Immunsuppressiva auf die membrangebundene BAFF-Expression, -Übersicht der Resultate**

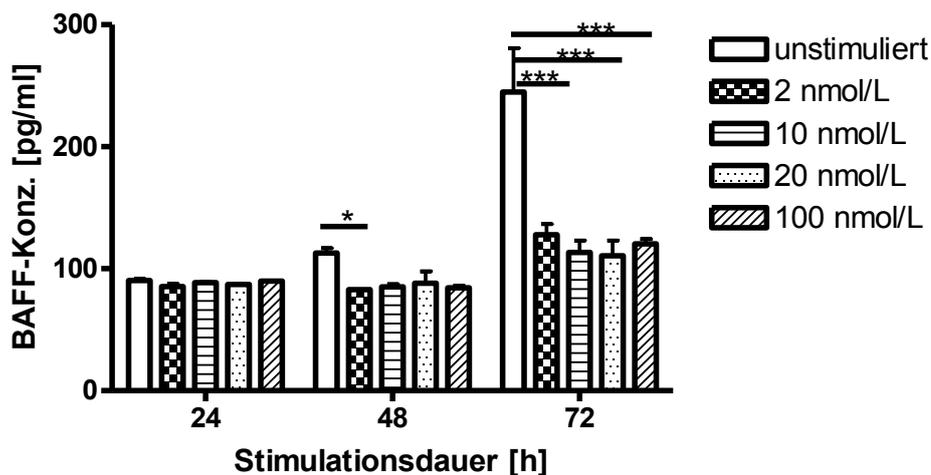
### **3.4 Einfluss von Immunsuppressiva auf die Freisetzung des B-Zell aktivierenden Faktors (BAFF) in Monozyten**

BAFF liegt neben der membrangebundenen Form auch in einer löslichen, freigesetzten

Form vor. Zusätzlich zu der Untersuchung des Einflusses von Immunsuppressiva auf die intrazelluläre und membrangebundene BAFF-Expression wurde auch deren Wirkung auf die BAFF-Sekretion in den Zellkulturüberständen von Monozyten eruiert. Dazu wurden U937-Zellen stimuliert und nach dem entsprechenden Inkubationszeitraum der Zellkulturüberstand abgenommen. Mittels eines kommerziell erhältlichen BAFF-ELISAs wurde die lösliche BAFF-Konzentration in den Zellkulturüberständen bestimmt (s. Methoden S. 21 f). Die dargestellten Ergebnisse sind, sofern nicht anders vermerkt, Mittelwerte aus Duplikaten einzelner Versuche, die in einem weiteren unabhängigen Versuch reproduziert wurden.

### 3.4.1 Rapamycin verringert die BAFF-Freisetzung in Monozyten

Da es durch Rapamycin zu einer signifikanten Abnahme der intrazellulären und der membrangebundenen BAFF-Expression kam, wurde ferner die Konzentration von löslichem BAFF in den Zellkulturüberständen mittels ELISA untersucht. Dazu wurden U937-Zellen 24, 48 und 72 h mit 2, 10, 20 und 100 nmol/L Rapamycin stimuliert. Die 72stündige Inkubation resultierte in einer signifikanten Herunterregulierung der BAFF-Freisetzung durch Zugabe von 10, 20 und 100 nmol/L verglichen mit unstimulierten Zellen. Die ELISA-Analyse ist eine quantitative Untersuchungsmethode, weswegen die BAFF Konzentrationen der unstimulierten Zellen im Verlauf der Stimulationsdauer ansteigen. (BAFF-Konz. [pg/ml] unstimuliert:  $244,93 \pm 35,85$ ; 2 nmol/L:  $127,93 \pm 8,81$ ; 10 nmol/L:  $113,36 \pm 9,8$ ; 20 nmol/L:  $110,57 \pm 12,58$ ; 100 nmol/L:  $120,40 \pm 3,94$ ; Abb. 18). Nach 48 h war eine signifikante Abnahme durch Zugabe von 2 nmol/L Rapamycin nachweisbar (BAFF-Konz. [pg/ml] unstimuliert:  $112,84 \pm 4,133$ ; 2 nmol/L:  $82,95 \pm 0$ ; 10 nmol/L:  $85,16 \pm 2,16$ ; 20 nmol/L:  $88,12 \pm 9,69$ ; 100 nmol/L:  $84,48 \pm 1,67$ ; Abb. 19). Eine 24stündige Inkubation ergab keine Veränderung der löslichen BAFF-Konzentration verglichen mit unstimulierten Zellen (BAFF-Konz. [pg/ml] unstimuliert:  $90,29 \pm 1,21$ ; 20 nmol/L:  $85,50 \pm 2,16$  10 nmol/L:  $88,74 \pm 0,49$  20 nmol/L:  $87,19 \pm 0,72$  100 nmol/L:  $89,77 \pm 0,49$ ; Abb. 18).



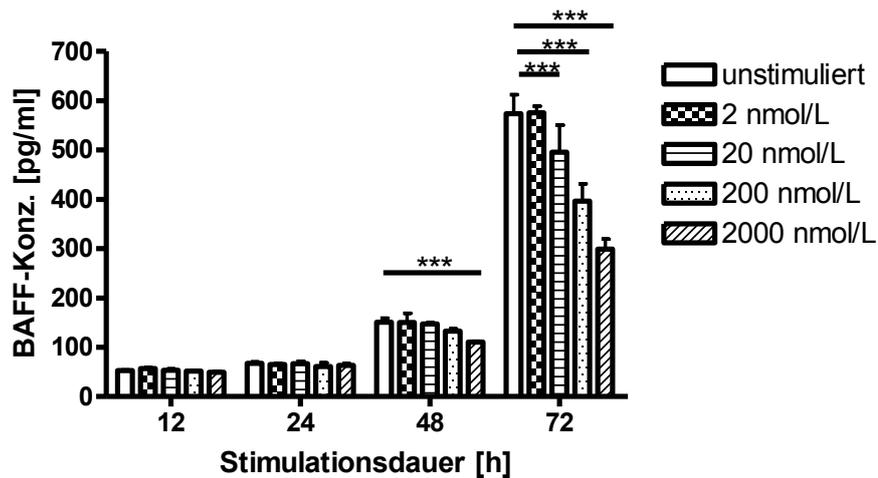
**Abb. 18: Herabsetzung der löslichen, freigesetzten BAFF-Konzentration durch Rapamycin in Monozyten.**

U937-Zellen wurden 24, 48 und 72 h mit 2 (kariert), 10 (liniert), 20 (gepunktet) und 100 nmol/L (schraffiert) stimuliert. Die Konzentration von löslichem BAFF in den Kulturüberständen wurde mit Hilfe eines BAFF-ELISAs ermittelt (n = 2). Rapamycin führte nach 48 und 72 h zu einer signifikanten Reduktion der BAFF-Sekretion verglichen mit unstimulierten Zellen (leer). Die kleinen Balken zeigen die Standardabweichung (SD) an. \* = p < 0,05, \*\*\* = p < 0,001

### 3.4.2 Cyclosporin A führt zu einer Abnahme der BAFF-Freisetzung in Monozyten

Nachdem eine signifikante Reduktion sowohl der intrazellulären als auch der membrangebundenen BAFF-Expression durch Cyclosporin A gezeigt werden konnte, wurde dessen Wirkung auf die BAFF-Freisetzung in den Zellkulturüberständen untersucht. Die U937-Zellen wurden mit vier Konzentrationen, 2, 20, 200 und 2000 nmol/L, Cyclosporin A stimuliert. Es folgte die Messung der freigesetzten BAFF-Konzentration in den Zellkulturüberständen mittels ELISA nach 12-, 24-, 48-, und 72stündiger Inkubation. Nach 12 und 24 h konnte keine Abnahme der BAFF-Konzentration detektiert werden (BAFF-Konz. [pg/ml], 12h unstimuliert:  $52,68 \pm 1,02$ ; 2 nmol/L:  $57,15 \pm 1,67$ ; 20 nmol/L:  $53,51 \pm 2,5$ ; 200 nmol/L:  $51,51 \pm 1,89$ ; 2000 nmol/L:  $49,26 \pm 1,7$ ; 24 h unstimuliert:  $67,59 \pm 2,8$ ; 2 nmol/L:  $65,145 \pm 2,43$ ; 20 nmol/L:  $66,96 \pm 4,6$ ; 200 nmol/L:  $61,17 \pm 7,2$ ; 2000 nmol/L:  $63,46 \pm 3,37$ ; s. Abb. 19). Nach 48 h Stimulationsdauer zeigte sich eine signifikante Herunterregulierung der BAFF-Konzentration durch Zugabe von 2000 nmol/L Cyclosporin A (BAFF-Konz. [pg/ml], 48 h unstimuliert:  $150,78 \pm 8,09$ ; 2 nmol/L:  $149,93 \pm 18,80$ ; 20 nmol/L:  $147,17 \pm 2,22$ ; 200 nmol/L:  $132,42 \pm 4,89$ ; 2000 nmol/L:  $110,68 \pm 1,8$ ; Abb. 19) Eine signifikante

Reduzierung der löslichen BAFF-Konzentration konnte nach 72 h durch Zugabe von 20, 200 und 2000 nmol/L detektiert werden (BAFF-Konz. [pg/ml], 72 h unstimuliert:  $573,98 \pm 38,20$ ; 2 nmol/L:  $575,42 \pm 13,27$ ; 20 nmol/L:  $495,51 \pm 54,97$ ; 200 nmol/L:  $396,64 \pm 35,0$  2000 nmol/L:  $298,91 \pm 20,41$ ; Abb. 19). Die Abnahme war konzentrationsabhängig. Dargestellt sind Mittelwerte aus Triplikaten einzelner Versuche die in zwei weiteren unabhängigen Versuchen reproduziert wurden.

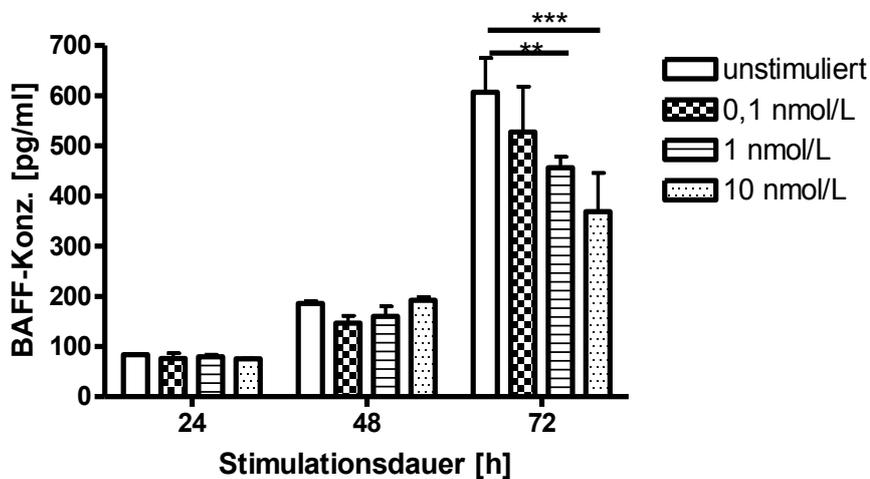


**Abb. 19: Cyclosporin A resultiert in einer Abnahme der BAFF-Freisetzung in Monozyten.** U937 Zellen wurden mit vier Konzentrationen Cyclosporin A, 2 (kariert), 20 (liniert), 200 (gepunktet) und 2000 nmol/L (schraffiert) für 12, 24, 48 und 72 h stimuliert (n = 3). Mittels ELISA wurde die BAFF-Freisetzung in den Zellkulturüberständen bestimmt. Nach 48 h führte Cyclosporin A verglichen mit unstimulierten Zellen (leer) zu einer signifikanten Abnahme der freigesetzten, löslichen BAFF-Konzentration durch Zugabe von 2000 nmol/L (schraffiert). Eine signifikante konzentrationsabhängige Reduktion der löslichen BAFF-Konzentration zeigte sich nach 72 h durch Zugabe von 20, 200 und 2000 nmol/L Cyclosporin A. Signifikanzen zwischen den Konzentrationen bestanden, wurden jedoch hier nicht dargestellt. Die dünnen Balken stellen die Standardabweichung (SD) dar. \*\*\* =  $p < 0,001$

### 3.4.3 Methotrexat führt zu einer Abnahme der BAFF-Freisetzung in Monozyten

Nachdem eine Zunahme der intrazellulären BAFF-Expression und eine Abnahme der membrangebundenen BAFF-Expression nach 72 h durch Zugabe von 10 nmol/L Methotrexat gezeigt werden konnte, wurde außerdem die freigesetzte BAFF-Sekretion in Zellkulturüberständen von Monozyten untersucht. U937-Zellen wurden mit drei Konzentrationen Methotrexat, 0,1, 1 und 10 nmol/L stimuliert und für 24, 48 und 72 h inkubiert. Danach wurde mittels ELISA die lösliche BAFF-Konzentration in den Zellkulturüberständen gemessen. Nach 72 h konnte eine signifikante Reduzierung der

BAFF-Freisetzung durch Zugabe von 1 und 10 nmol/L Methotrexat detektiert werden, die Herunterregulierung erfolgte konzentrationsabhängig. 10 nmol/L Methotrexat zeigte eine stärkere Abnahme der BAFF-Freisetzung als 1 nmol/L (BAFF-Konz. [pg/ml], 72h unstimuliert:  $606,72 \pm 68,23$ ; 0,1 nmol/L:  $527,58 \pm 90,17$ ; 1nmol/L:  $456,55 \pm 21,21$ ; 10nmol/L:  $368,98 \pm 76,98$ ; Abb. 20). Nach 24 und 48 h kam es zu keiner Änderung der BAFF-Freisetzung (BAFF-Konz. [pg/ml]: 24h unstimuliert:  $83,54 \pm 1,3$ ; 0,1 nmol/L:  $76,344 \pm 10,43$ ; 1 nmol/L:  $79,70 \pm 4,12$ ; 10 nmol/L:  $75,35 \pm 1,01$ ; 48h unstimuliert:  $185,87 \pm 4,6$ ; 0,1 nmol/L:  $146,92 \pm 14,45$  1 nmol/L:  $160,22 \pm 19,88$ ; 10 nmol/L:  $192,23 \pm 6,35$ ; Abb. 20).



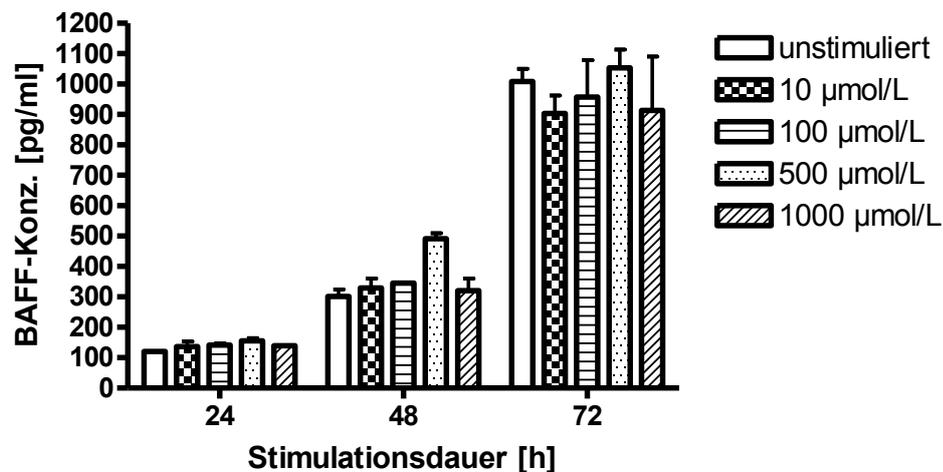
**Abb. 20: Herunterregulierung der BAFF-Sekretion in Monozyten durch Methotrexat.**

U937-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit 0,1 (kariert), 1 (liniert) und 10 nmol/L (gepunktet) Methotrexat stimuliert (n = 2). Bei der anschließenden Untersuchung der Kulturüberstände mittels ELISA zeigte sich eine signifikante Abnahme der BAFF-Konzentration nach 72 h durch Zugabe von 1 und 10 nmol/L Methotrexat, verglichen mit unstimulierten Zellen (leer). Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Verringerung der löslichen, freigesetzten BAFF-Konzentration. Die dünnen Balken stellen die Standardabweichung (SD) dar. \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$

### 3.4.4 Valproinsäure zeigt keinen Effekt auf die BAFF-Freisetzung in Monozyten

Valproinsäure resultierte in einer signifikanten Herunterregulierung der membrangebundenen, - sowie einer Abnahme der intrazellulären BAFF-Expression. Weiterhin wurde dessen Effekt auf die BAFF-Freisetzung in Zellkulturüberständen mittels ELISA ermittelt. U937-Zellen wurden mit vier Konzentrationen, 10, 100, 500 und 1000  $\mu\text{mol/L}$  Valproinsäure stimuliert und für 24, 48 und 72 h inkubiert. Im Vergleich mit unstimulierten Zellen konnte keine Änderung der BAFF-Sekretion durch Valproinsäure

nachgewiesen werden. Zu keinem Stimulationszeitraum konnte ein reproduzierbarer Einfluss von Valproinsäure auf lösliches BAFF in Zellkulturüberständen detektiert werden (BAFF-Konz. [pg/ml], 24 h unstimuliert:  $120,33 \pm 0,36$ ; 10  $\mu\text{mol/L}$ :  $136,29 \pm 17,15$ ; 100  $\mu\text{mol/L}$ :  $141,73 \pm 5,7$ ; 500  $\mu\text{mol/L}$ :  $155,51 \pm 8,51$ ; 1000  $\mu\text{mol/L}$ :  $139,05 \pm 1,87$ ; 48 h unstimuliert:  $302,41 \pm 22,79$ ; 10  $\mu\text{mol/L}$ :  $329,48 \pm 31,33$ ; 100  $\mu\text{mol/L}$ :  $345,28 \pm 0,99$ ; 500  $\mu\text{mol/L}$ :  $49,21 \pm 18,76$ ; 1000  $\mu\text{mol/L}$ :  $320,03 \pm 40,7$ ; 72 h unstimuliert:  $1008,68 \pm 41,98$ ; 10  $\mu\text{mol/L}$ :  $903,85 \pm 58,36$ ; 100  $\mu\text{mol/L}$ :  $957,416 \pm 120,9$ ; 500  $\mu\text{mol/L}$ :  $1053,1 \pm 60,7$ ; 1000  $\mu\text{mol/L}$ :  $913,54 \pm 176,51$ ; Abb. 21).



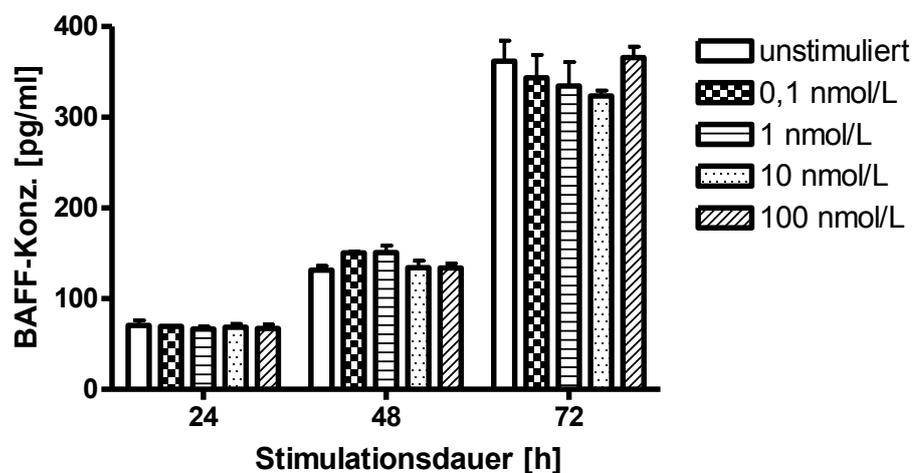
**Abb. 21: Durch Valproinsäure kommt es zu keiner Veränderung der BAFF-Freisetzung in Monozyten.**

U937-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit vier Konzentrationen, 10 (kariert), 100 (liniert), 500 (gepunktet) und 1000  $\mu\text{mol/L}$  (schraffiert) Valproinsäure stimuliert ( $n = 2$ ). Danach wurde die Konzentration von löslichem BAFF in den Zellkulturüberständen mittels ELISA gemessen. In den Kulturüberständen der mit Valproinsäure-behandelten Zellen zeigte sich zu keinem Stimulationszeitraum eine reproduzierbare Zu-, oder Abnahme der löslichen BAFF-Konzentrationen verglichen mit unstimulierten Zellen (leer). Die Standardabweichung (SD) ist als dünner Balken angegeben.

### 3.4.5 Die lösliche BAFF-Konzentration in Kulturüberständen von Monozyten wird durch Mycophenolatmofetil nicht beeinflusst

Die intrazelluläre und membrangebundene BAFF-Expression wurde durch das Immunsuppressivum Mycophenolatmofetil nicht verändert. Ergänzend wurde die Wirkung von Mycophenolatmofetil auf die BAFF-Freisetzung untersucht. Dazu wurden U937-Zellen mit vier verschiedenen Konzentrationen, 0,1, 1, 10 und 100 nmol/L, Mycophenolatmofetil stimuliert. Nach 24-, 48-, und 72-stündiger Inkubation wurde die

BAFF-Konzentration in den Zellkulturüberständen mittels ELISA bestimmt. Zu keinem der untersuchten Stimulationszeiträume und durch keine der verwendeten Konzentrationen kam es zu einer signifikanten Zu- oder Abnahme der BAFF-Konzentration in den Zellkulturüberständen (BAFF-Konz. [pg/ml], 24 h unstimuliert:  $70,35 \pm 5,82$ ; 0,1 nmol/L:  $69,41 \pm 0,21$ ; 1 nmol/L:  $66,54 \pm 2,6$ ; 10 nmol/L:  $68,5 \pm 3,6$ ; 100 nmol/L:  $67,00 \pm 4,47$ ; 48 h: unstimuliert:  $131,49 \pm 4,8$ ; 0,1 nmol/L:  $150,46 \pm 1,31$ ; 1 nmol/L:  $150,68 \pm 7,89$ ; 10 nmol/L:  $134,2 \pm 7,64$ ; 100 nmol/L:  $133,83 \pm 5,08$ ; 72 h: unstimuliert:  $361,88 \pm 22,56$ ; 0,1 nmol/L:  $343,43 \pm 25,56$ ; 1 nmol/L:  $334,57 \pm 26,33$ ; 10 nmol/L:  $323,47 \pm 6,00$ ; 100 nmol/L:  $365,96 \pm 11,86$ ; Abb. 22).



**Abb. 22: Mycophenolatmofetil zeigt keinen Einfluss auf die BAFF-Freisetzung.**

Zellen der Linie U-937 wurden 24, 48 und 72 h mit 0,1 (kariert), 1 (liniert), 10 (gepunktet) und 100 nmol/L (schraffiert) Mycophenolatmofetil stimuliert. Mittels ELISA wurde anschließend die BAFF-Konzentration in den Zellkulturüberständen bestimmt ( $n = 2$ ). Zu keinem der Stimulationszeiträume konnte durch die verwendeten Konzentrationen Mycophenolatmofetil eine Regulierung der BAFF-Freisetzung detektiert werden. Die dünnen Balken stellen die Standardabweichung (SD) dar.

### 3.4.6 Zusammenfassung der Resultate der Versuche zur Wirkung von Immunsuppressiva auf die BAFF-Freisetzung

Zusammenfassend konnte mit diesen Experimenten gezeigt werden, dass die Immunsuppressiva Rapamycin, Cyclosporin A und Methotrexat zu einer signifikanten Herunterregulierung der Freisetzung von löslichem BAFF an das umgebende Medium von U937-Zellen führen (Tab. 5). Die größte Wirkung war dabei jeweils nach 72 h zu detektieren. Methotrexat und Cyclosporin A zeigten eine stark konzentrationsabhängige

Reduzierung der BAFF-Freisetzung, Rapamycin zeigte hingegen nur eine Tendenz zur Konzentrationsabhängigkeit. Valproinsäure und Mycophenolatmofetil zeigten keinen Einfluss auf die BAFF-Freisetzung in U937-Zellen.

Immun-suppressivum	Stimulations-dauer [h]	Konzentration des Stimulus	Wert [pg/ml]	Signifikanz-niveau	Abnahme (-) Zunahme (+) [%]
Rapamycin	72	unstimuliert	244,93	---	---
		2 nmol/L	127,93	---	47,7 (-)
		20 nmol/L	110,57	p < 0,001	54,86 (-)
		100 nmol/L	120,40	p < 0,001	50,8 (-)
Cyclosporin A	72	unstimuliert	573,98	---	---
		20 nmol/L	495,51	p < 0,001	13,67 (-)
		200 nmol/L	396,64	p < 0,001	30,89 (-)
		2000 nmol/L	298,91	p < 0,001	47,92 (-)
Methotrexat	72	unstimuliert	606,72	---	---
		0,1 nmol/L	527,58	---	13,14 (-)
		1 nmol/L	456,55	p < 0,01	24,75 (-)
		10 nmol/L	368,98	p < 0,001	39,18 (-)
Valproinsäure	24	unstimuliert	1008,68	---	---
		100 µmol/L	957,42	---	0,50 (-)
		500 µmol/L	1053,1	---	0,43 (+)
		1000 µmol/L	913,54	---	0,94 (-)
Mycophenolat mofetil	72	Unstimuliert	361,88	---	---
		1 nmol/L	334,57	---	0,75 (-)
		10 nmol/L	323,47	---	1,06 (-)
		100 nmol/L	365,96	---	0,11(+)

**Tab. 5: Wirkung von Immunsuppressiva auf die BAFF-Freisetzung, -Übersicht der Resultate**

## 4. Diskussion

BAFF, ein Mitglied der TNF Superfamilie, ist ein Faktor der entscheidend an der Reifung, dem Überleben und der Immunglobulinsekretion von B-Zellen beteiligt ist. Er wird von Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen gebildet und besitzt drei Rezeptoren, die vor allem von Plasmazellen und B-Zellen exprimiert werden. Eine BAFF-Überexpression im Mausmodell führt zur Ausbildung von Krankheitsbildern die Autoimmunerkrankungen wie dem SLE und dem SS, ähneln. Eine Bedeutung von BAFF in der Entwicklung der B-Zell Toleranz wurde postuliert. Normalerweise führen körpereigene Antigene durch starke apoptotische Signale zum programmierten Zelltod einer B-Zelle. Durch ein Überangebot von BAFF werden jedoch so starke Überlebenssignale induziert, dass autoreaktive B-Zellen überleben können und dadurch zur Entstehung von Autoimmunität beitragen (Vincent et al. 2014; Mackay and Browning 2002). Zu den Autoimmunerkrankungen, die erhöhte BAFF-Serumlevel aufweisen, gehören der Systemische Lupus erythematodes, das Sjögren Syndrom, die Rheumatoide Arthritis, die Sklerodermie und die Myasthenia gravis (Lanteri et al. 2014; Cheema et al. 2001; Mariette et al. 2003; Becker-Merok et al. 2006; Kim et al. 2008). Nach allogener Stammzelltransplantation oder nach Transplantation eines soliden Organs zeigten sich ebenfalls erhöhte BAFF-Konzentrationen in Patientensera, so dass auch in der Transplantationsmedizin BAFF in den Interessenfokus der Forschung gerückt ist (Sarantopoulos et al. 2009). Neuere Studien vermuten nicht nur eine tragende Rolle von BAFF in Autoimmunität und Transplantationsmedizin, sondern ebenfalls in Tumorpathologie, Infektiologie und Allergie. So wurden erhöhte BAFF-Serumlevel bei Patienten mit Hepatitis C, HIV, Asthma bronchiale, Malaria, allergischer Rhinitis, Multiplem Myelom und der Chronisch lymphatischen Leukämie detektiert (Fragioudaki et al. 2012; Molica et al. 2010; Scholzen et al. 2014; Vincent et al. 2014; Rodriguez et al. 2003; Kang et al. 2006; Toubi et al. 2006; Kato et al. 2008). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass in der juvenilen idiopathischen Arthritis, dem SLE und dem SS die Höhe der BAFF-Serumlevel mit der Krankheitsaktivität korrelieren (Gheita et al. 2012; Nishikawa et al. 2016; Zollars et al. 2015; Bosello et al. 2008). Die Beeinflussung von BAFF scheint damit ein vielversprechendes potenzielles Ziel für die Therapie zahlreicher Erkrankungen zu sein. Diese Annahme wurde durch die Zulassung von Belimumab einem Antikörper, der BAFF neutralisiert, bestätigt. Zur Therapie von Autoimmunerkrankungen sowie zur Prävention der Graft-versus-Host-Disease (GvHD) werden bereits verschiedene Immunsuppressiva eingesetzt deren Wirkmechanismen jedoch nicht vollständig geklärt sind. Der Effekt von

Immunsuppressiva auf die Expression von membrangebundenen, zytoplasmatischen und löslichem BAFF in der monozytären Zelllinie U937 wurde deshalb in dieser Arbeit untersucht.

#### **4.1 Modulation des B-Zellaktivierenden Faktors**

Es wurde die Wirkung der Immunsuppressiva Rapamycin, Cyclosporin A, Methotrexat und Mycophenolatmofetil sowie des Immunmodulators Valproinsäure auf die BAFF-Expression in Monozyten analysiert. Die Untersuchung der BAFF-Expression erfolgte in U937-Zellen, einer etablierten immortalisierten Lymphomzelllinie, die das Expressionsverhalten eines promonozytischen Entwicklungsstadiums widerspiegelt (Sundstrom and Nilsson 1976). Mittels Durchflusszytometrie wurde die membranständige und zytoplasmatische BAFF-Expression in U937-Zellen gemessen. Isotypkontrollen wurden bei allen durchflusszytometrischen Untersuchungen mitgeführt, um falsch positive Ergebnisse durch unspezifische Bindung zu vermeiden. Eine signifikante Reduzierung der BAFF-Expression auf zytoplasmatischer Proteinebene zeigte sich durch Rapamycin und Cyclosporin A. Der Effekt war jeweils maximal nach 48h. Interessanterweise erzeugte Mtx einen signifikanten Anstieg der intrazellulären BAFF-Expression nach 72 h. Valproinsäure und Mycophenolatmofetil zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die zytoplasmatische BAFF-Expression. Durch Rapamycin, Cyclosporin A und Valproinsäure konnte eine signifikante Herunterregulierung der membrangebundenen BAFF-Expression detektiert werden mit einem Maximum nach jeweils 48 h. Methotrexat regulierte membranständiges BAFF nach 24 und 72 h signifikant herunter. Mycophenolatmofetil resultierte nicht in einer Abnahme der membrangebundenen BAFF-Expression. Da BAFF auch in löslicher Form vorliegen kann, wurden die BAFF Konzentrationen in den Zellüberständen der stimulierten Monozyten mittels ELISA analysiert. Es zeigte sich eine signifikante Herunterregulierung der löslichen BAFF-Freisetzung in den Überständen durch Rapamycin, Cyclosporin A und Methotrexat mit einem Maximum nach jeweils 72 h. Die Freisetzung von löslichen BAFF wurde durch Valproinsäure und Mycophenolatmofetil nicht beeinflusst.

## **4.2 Wirkung von Cortison auf BAFF**

Zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen und in der Transplantationsmedizin werden heutzutage verschiedene Immunsuppressiva eingesetzt. Ein Standardtherapeutikum vor allem für B-Zell vermittelte Autoimmunerkrankungen ist Cortison. Eine Abnahme der BAFF-Expression sowohl auf Proteinebene als auch auf transkriptioneller Ebene konnte in Monozyten durch diese Wirkstoffgruppe nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich eine Reduktion der membrangebundenen und zytoplasmatischen BAFF-Expression. Auch konnte eine Abnahme der löslichen BAFF-Freisetzung in den Zellüberständen und eine Reduktion der mRNA detektiert werden (Bick, S. 2011). Corticosteroide zeigten einen inhibitorischen Effekt auf die BAFF-Expression in vitro aber auch in vivo. Durch Corticoide konnte in Patienten die an SLE erkrankt waren eine Abnahme der BAFF Serumlevel detektiert werden (Stohl et al. 2003). In weiteren Erkrankungen wie dem Morbus Basedow (Vannucchi et al. 2012), der Rheumatoiden Arthritis (Reyes et al. 2008), der Wegener Granulomatose (Krumbholz et al. 2005) und der Autoimmunthrombozytopenie (Zhu et al. 2009) wurde durch die Behandlung mit Corticoiden eine Abnahme der BAFF-Serumlevel festgestellt. Es ist anzunehmen, dass die genomische Regulation über ein „glucocorticoid receptor response element“, das in der Promoterregion von BAFF enthalten ist, erfolgt. Ebenso könnte aber auch eine Wechselwirkung der Corticoide mit den Transkriptionsfaktoren NFAT und NFκB (engl.: nuclear factor „kappa light chain enhancer“ of activated B-cells) die Herunterregulierung herbeiführen (Adcock and Caramori 2001; Kassel and Herrlich 2007). Für diese beiden Transkriptionsfaktoren sind Konsensussequenzen im BAFF Gen beschrieben (Fu et al. 2006).

## **4.3 Gibt es einen gemeinsamen Wirkmechanismus der verwendeten Immunsuppressiva über die Transkriptionsfaktoren NFAT und NFκB?**

Obwohl die in dieser Arbeit untersuchten Immunsuppressiva zu unterschiedlichen Wirkstoffklassen gehören, ist eine Regulation über die Transkriptionsfaktoren NFAT und NFκB als gemeinsamer Nenner anzunehmen. Der Promoter von BAFF weist sowohl eine NFκB als auch eine NFAT Konsensussequenz auf, - eine Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren führt zu einer Stimulation der BAFF-Expression (Fu et al. 2006).

In dieser Arbeit konnte eine signifikante, zytoplasmatische und membrangebundene Herunterregulierung von BAFF durch Cyclosporin A nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde die Freisetzung von löslichem BAFF in den Zellüberständen signifikant herabgesetzt. Cyclosporin A inhibiert die Phosphataseaktivität vom zytosolischen Protein Calcineurin. Aktiviertes Calcineurin führt zur Dephosphorylierung von NFAT einem Transkriptionsfaktor der in hyperphosphorylierter, inaktiver Form im Cytosol vorliegt. Durch Cyclosporin A wird die Dephosphorylierung und nukleäre Translokation von NFAT verhindert. Eine Abnahme der BAFF-Expression durch CsA in Non Hodgkin Lymphom B-Zellen wurde beschrieben (Fu et al. 2006). In Osteoklasten wurde durch Inhibierung der Proteinkinase MEK (Mitogen-activated protein kinase kinase) sowohl eine Reduktion des Transkriptionsfaktors NFAT, als auch eine verminderte Sekretion von BAFF und APRIL festgestellt. Es könnte sich dabei um eine Regulation von BAFF über NFAT handeln (Breitkreutz et al. 2007). Es gibt Hinweise darauf dass Cyclosporin A nicht nur NFAT, sondern auch NFκB beeinflusst (Schmidt et al. 1990; Frantz et al. 1994; Gualberto et al. 1998; Lee and Burckart 1998; Valdes et al. 2008). In Monozyten inhibierte Cyclosporin A die IL-12p40 Expression über eine Herunterregulierung von NFκB (Ma et al. 2007). Des Weiteren wurde in T-Lymphozyten durch Tacrolimus, einem weiteren Calcineurininhibitor, NFκB inhibiert (Vafadari et al. 2010). NFκB ist ein ubiquitär vorkommender Transkriptionsfaktor, welcher an der Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse maßgeblich beteiligt ist und als zentraler Koordinator in der menschlichen Immunantwort fungiert. NFκB bezeichnet eine Familie von fünf Proteinen die eine Homologiesequenz, die sogenannte Rel Domäne besitzen. In dieser liegt auch die Bindungsregion für IκB (Inhibitor of κB) einem inhibitorischen Regulator von NFκB. Über ein komplexes System intrazellulärer Signalkaskaden wird NFκB in Reaktion auf sehr heterogene Stimuli reguliert. Dabei wird eine klassische und alternative Aktivierung unterschieden. Die Aktivierung des klassischen Weges erfolgt unter anderem durch den T-Zellrezeptor, den B-Zellrezeptor und den TNF-Rezeptor. Der alternative Weg wird durch Lipopolysaccharid (LPS), Lymphotoxin B oder CD 40 aktiviert (Karin and Lin 2002). BAFF kann über Bindung an den BAFF-Rezeptor beide Signalwege induzieren (Fu et al. 2009). Da die BAFF-Expression durch NFκB reguliert wird, BAFF aber selbst auch die NFκB-Aktivierung stimuliert, handelt es sich um positives Feedback. Durch Calcineurin wurde eine Aktivierung von NFκB über eine Regulation von IκB in Makrophagen nachgewiesen (Kim et al. 2004). Intravenöses Immunglobulin führt zu einer Abnahme von BAFF in Monozyten und in vivo,- als Wirkmechanismus wurde eine Regulation von IκB und damit NFκB beschrieben (Bick et al. 2013; Ichiyama et al. 2004). Auch durch die Cichoriensäure, einem Derivat der Kaffeesäure, wurde eine Herunterregulierung von BAFF über NFκB in B-Zellen

nachgewiesen (Chen et al. 2017). Ein ähnlicher Wirkmechanismus ist für Cyclosporin A anzunehmen. Über eine Inhibierung von Calcineurin und dadurch den Transkriptionsfaktor NFκB führt Cyclosporin A zu einer Suppression der BAFF-Expression auf Proteinebene.

Rapamycin, ein m-TOR Antagonist, zeigte in meiner Studie eine signifikante Reduktion der zytoplasmatischen und membrangebundenen BAFF-Expression. Auch auf die Freisetzung von löslichem BAFF hatte Rapamycin einen signifikanten inhibitorischen Effekt. Rapamycin hemmt die Serin / Threonin Kinase m-TOR. M-TOR besteht aus zwei Komplexen mTOR 1 und mTOR 2, wobei lediglich mTOR 1 durch Rapamycin gehemmt wird (Lieberthal and Levine 2009). Es wurde gezeigt dass Rapamycin die Expression von zahlreichen Chemokinen über eine Suppression von NFκB in primären Monozyten herunterreguliert (Lin et al. 2014). Es ist anzunehmen, dass die Suppression von BAFF auch über die Herunterregulierung des Transkriptionsfaktors NFκB erfolgt, da durch mehrere Autoren eine Regulation des Transkriptionsfaktors durch Rapamycin in verschiedenen Zelllinien beschrieben wurde. Durch Rapamycin wurde sowohl in Podozyten eine Abnahme der IL-6 Expression über eine NFκB Inhibition nachgewiesen, als auch in Monozyten eine Herunterregulierung des Transkriptionsfaktors detektiert (Gao et al. 2015; Muller-Krebs et al. 2013). In Prostatatumorzellen wurde gezeigt, dass m-TOR1 über eine Interaktion mit IκK (IκB Kinase Komplex) zu einer Regulierung von IκB und damit NFκB führt (Dan et al. 2008). Für die beiden Immunsuppressiva Cyclosporin und Rapamycin ist damit die signifikante Reduktion der BAFF-Expression über eine Regulierung von NFAT und NFκB anzunehmen. Ein weiterer Wirkmechanismus von Rapamycin könnte jedoch auch über die Regulation der Zellproliferation bestehen. Es wurde in B-Zellen festgestellt dass BAFF zu einer Inhibierung der Proteinphosphatase 2 A (PP2A) führt. Dadurch wird die Kinase Erk1/2 (Extracellular signal regulated protein kinase) aktiviert, wodurch die Zellproliferation angeregt wird (Liang et al. 2014). Durch Rapamycin kommt es über die Blockade von mTOR zu einer Aktivierung der Proteinphosphatase 2 A (PP2A). Infolgedessen wird über die Inhibition der Kinase Erk1/2 die durch BAFF hervorgerufene Zellproliferation inhibiert (Zeng et al. 2015).

Zudem hat sich herausgestellt, dass neutrophile Granulozyten eine wichtige Rolle in der Immunpathogenese des SLE innehaben. Aktivierte Neutrophile Granulozyten können eine extrazelluläre faserige Matrix bestehend aus Chromatin sogenannte NETs (neutrophil extrazellular traps) bilden, ein Vorgang der als Netose bezeichnet wird. Diese NETs können Pathogene binden. Die gesteigerte Produktion von Interferon Typ 1, BAFF und April der neutrophilen Granulozyten im Knochenmark führt dabei zu einer gesteigerten Antikörperproduktion und dadurch zur Steigerung der Netose. Es

wurde gezeigt, dass Cyclosporin A durch eine Änderung des intrazellulären Calciumspiegels zu einer Inhibierung der Netose führt. Rapamycin hat jedoch keinen regulativen Effekt auf die Bildung von NETs. Um die Rolle von BAFF im Vorgang der Netose und der Einfluss von Immunsuppressiva auf die Bildung von NETs näher zu beleuchten wären weitere Studien erforderlich (Colonna et al. 2014; Gupta et al. 2014; Smith and Kaplan 2015).

In der vorliegenden Arbeit konnte auch eine Reduzierung der membrangebundenen und löslichen BAFF-Expression durch Methotrexat detektiert werden. Methotrexat führt durch eine intrazelluläre Adenosinfreisetzung zu einer Inhibierung von I $\kappa$ B $\alpha$ , wodurch letztendlich NF $\kappa$ B gehemmt wird. Eine suppressive Wirkung von Methotrexat auf NF $\kappa$ B wurde in T-Zellen, Monozyten und Epithelien nachgewiesen (Majumdar and Aggarwal 2001). Des Weiteren wurde eine Inhibition von NF $\kappa$ B durch Methotrexat in Fibrozyten und T-Zellen festgestellt (Spurlock et al. 2015). Die Annahme dass die NF $\kappa$ B Suppression durch eine Adenosinfreisetzung verursacht wird, wird durch eine Studie von Arasa et al. gestützt. Diese zeigten, dass ein Adenosinagonist zu einer Herunterregulierung von Cytokinen über eine NF $\kappa$ B Regulation führte (Arasa et al. 2014). Der Anstieg der BAFF-Expression, der auf zytoplasmatischer Expressionsebene durch Methotrexat gezeigt wurde, kann durch diesen Regulationsmechanismus jedoch nicht erklärt werden. Valproinsäure ist ein Antiepileptikum und gehört zu der Wirkstoffgruppe der Histondeacetylaseinhibitoren (HDACI). HDACI greifen in die Genregulation ein und weisen antitumoröse sowie immunmodulatorische Eigenschaften auf. Es konnte gezeigt werden dass HDACI proinflammatorische Proteine wie z.B. IF-6, IF-12 und INF- $\gamma$  herunterregulieren (Mishra et al. 2003). In weiteren Studien konnten antiinflammatorische Effekte durch verschiedene Histondeacetylaseinhibitoren in vivo und in vitro bestätigt werden. So wurde in Monozyten durch HDACI eine Abnahme der Expression von proinflammatorischen Cytokinen wie MIP1- $\alpha$  (engl.: macrophage inflammatory protein), und MCP-1 (engl.: macrophage chemotactic protein) detektiert. Auch im Model für chronisch entzündliche Darmerkrankungen wurde durch Valproinsäure eine Abnahme von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  aufgezeigt (Cantley et al. 2015; Hull et al. 2016; Adcock 2007; Edwards et al. 2011). Eine Herunterregulierung von NF $\kappa$ B durch Valproinsäure und weitere HDACI wurde durch Arbeitsgruppen postuliert (Ichiyama et al. 2000; Ogbomo et al. 2007; Fabre et al. 2008). Im Widerspruch zu diesen Arbeitsgruppen stellten Go et al. jedoch eine Aktivierung von NF $\kappa$ B in neuronalen Progenitorzellen fest (Go et al. 2011). In der Akuten myeloiden Leukämie und anderen Tumorerkrankungen wurden erhöhte BAFF Serumlevel nachgewiesen (Bolkun et al. 2015; Novak et al. 2004). Neben dem immunmodulatorischen Wirkmechanismen konnten durch HDACI auch antitumoröse

Effekte nachgewiesen werden. Trichostatin A ein weiterer HDACI führte zu einer erhöhten Expression von MHC Klasse I Komplexen an der Zelloberfläche von Tumorzellen. Dadurch wird die Anfälligkeit dieser Zellen für cytotoxische T-Zellen erhöht (Setiadi et al. 2008). Eine Modulation von BAFF oder ein Zusammenhang der verschiedenen Wirkmechanismen mit BAFF wurde in der aktuellen Literatur nicht beschrieben. Eine Suppression der membranständigen BAFF-Expression durch Valproinsäure wurde in meiner Studie nachgewiesen. Da jedoch weder eine Suppression der zytoplasmatischen BAFF-Expression noch eine Wirkung auf die Freisetzung von löslichen BAFF in meiner Studie detektiert werden konnte, ist eine relevante Beeinflussung von BAFF durch Valproinsäure unwahrscheinlich.

Mycophenolatmofetil zeigte in dieser Arbeit keinen Einfluss auf die BAFF-Expression. MMF ist ein reversibler Inhibitor der Inosinmonophosphat-dehydrogenase, ein Enzym das an der „de-novo“ Synthese von Guanodin beteiligt ist. B- und T- Lymphozyten sind abhängig von der „de novo“ Purinbiosynthese, so dass MMF zu einer Abnahme der B- und T- Lymphozytenproliferation führt. Zur NFκB Regulation durch MMF fanden sich widersprüchliche Daten. Zwei Arbeitsgruppen wiesen eine Inhibierung des TNF-α stimulierten NFκB-Transduktionsweges durch MMF in Endothelzellen und Colonepithelzellen nach (Olejarz et al. 2014; Lee et al. 2008). In T-Zellen konnte hingegen keine Inhibierung von NFκB durch MMF detektiert werden (Vafadari et al. 2010). In dieser Arbeit wurden Zeiträume mit einer Stimulationszeitraum der Immunsuppressiva von bis zu 72 h betrachtet. Jedoch zeigt MMF in der klinischen Anwendung oftmals erst einen Wirkeintritt nach Wochen bis Monaten nach Beginn der Therapie (Conti et al. 2014). So erscheint es durchaus möglich, dass in dieser Arbeit zu kurze Zeiträume gewählt wurden, um eine mögliche Wirkung von MMF auf die BAFF-Expression zu detektieren. Eine Regulation der BAFF-Expression in vitro durch MMF wurde bisher auch in anderen Arbeitsgruppen nicht aufgezeigt.

#### ***4.4 Verknüpfung der Ergebnisse mit der klinischen Anwendung***

In Patienten die an SLE erkrankt waren, wurden erhöhte BAFF-Serumlevel detektiert und es konnte sogar eine Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität und erhöhten BAFF-Serumlevel nachgewiesen werden (Vincent et al. 2014; Zollars et al. 2015; Petri et al. 2008). Auch in Patienten mit RA und SS zeigten sich erhöhte BAFF-Serumlevel (Moura et al. 2013; Vadacca et al. 2010; Daridon et al. 2007). Zur Standardtherapie

von B-Zellvermittelten Autoimmunerkrankungen gehören Corticoide, wobei ein inhibitorischer Effekt von Cortison auf die BAFF-Expression in vivo und in vitro nachgewiesen werden konnte (Stohl et al. 2003, Vanucchi et al. 2012, Krumbholz et al. 2005, Zhu et al. 2009, Adcock and Caramori 2001, Kassel and Herrlich 2007). Unter den hier untersuchten Immunsuppressiva stellt Methotrexat ein Standardtherapeutikum vor allem in der Mono- und Kombinationstherapie der RA dar; aber auch in der Therapie des SLE wurde Mtx als Off-Label Medikament bei Therapieresistenz der Standardtherapeutika eingesetzt. Studien zeigten durch Therapie mit Mtx in der Behandlung des SLE eine Abnahme der Krankheitsaktivität und eine Einsparung an Corticoiden (Pego-Reigosa et al. 2013; Fortin et al. 2008). In einer klinischen Studie mit SLE Patienten wurde durch Mtx eine Abnahme der B-Zellen und der Autoantikörper festgestellt (Bohm 2003). In meiner Studie kann die Inhibierung der membranständigen BAFF-Expression nachgewiesen werden. Eine Studie in der Methotrexat zu einer Normalisierung der Cytokinexpression im Mausmodell des SLE führt, stützt diese Annahme (Segal et al. 1995). In klinischen Studien zur BAFF-Expression nach Mtx-Therapie zeigten sich widersprüchliche Daten. In Patienten, die an einer frühen rheumatoiden Arthritis litten, wurde eine Abnahme der BAFF-Serumlevel durch die Therapie mit Mtx detektiert (Bosello et al. 2008). Im Widerspruch dazu steht jedoch eine Studie an Patienten die an der juvenilen idiopathischen Arthritis erkrankt waren. Die Patienten zeigten erhöhte BAFF-Serumlevel (Gheita et al. 2012). Durch die Therapie mit Mtx konnte eine Abnahme der Immunglobulinbildung und eine Abnahme des B-Zell-Pools gezeigt werden, jedoch wurde keine Abnahme der BAFF-Serumlevel im Vergleich zu unbehandelten Patienten festgestellt (Glaesener et al. 2014).

Bei Therapieresistenz oder schweren Verläufen B-Zell vermittelter Autoimmunerkrankungen werden zusätzlich zur Standardtherapie die in dieser Arbeit untersuchten Immunsuppressiva Mycophenolatmofetil, Cyclosporin A und Rapamycin eingesetzt. Diese Medikamente sind aus der Transplantationsmedizin bekannt und werden im Off-Label Use zur Therapie autoimmuner Erkrankungen verwendet (Isenberg et al. 2015; Pego-Reigosa et al. 2013). MMF zeigte in mehreren Studien in der Therapie des SLE eine Abnahme der Krankheitsaktivität, der Proteinurie und eine Einsparung an Corticoiden (Karim et al. 2002; Posalski et al. 2009). Auch in der Therapie der Lupusnephritis führte MMF zu einer Remissionsinduktion (Cheng et al. 2013; Walsh et al. 2007; Zhu et al. 2007). Des Weiteren resultierte MMF in der Therapie der RA in einer Abnahme an Rheumafaktoren sowie in reduzierten IgG- und IgM-Konzentrationen (Goldblum 1993). Im Mausmodell des SLE wurde in Splenozyten durch MMF eine Suppression der Cytokine IFN- $\gamma$  und IL-10 sowie eine Abnahme der Immunglobulinbildung festgestellt (Jonsson and Carlsten 2001). Eine weitere Studie

wurde an Osteoklasten durchgeführt, die von Patientien stammen, die am SLE erkrankt waren. Dabei zeigten sich nach MMF-Therapie erniedrigte IFN- $\alpha$  Serumlevel. Monozyten sind die Zellen, die neben Makrophagen am meisten BAFF exprimieren, weswegen die Wirkung von MMF auf Monozyten genauer betrachtet wurde. In einer Studie von Weimer et al. wurden Monozyten von Patienten untersucht, die nach allogener Nierentransplantation mit MMF therapiert wurden. Dabei zeigte sich eine Abnahme der Sekretion der Chemokine IL-1 und TNF (Weimer et al. 2003). In einer weiteren Studie wurde eine Downregulation wichtiger adhäsiver Moleküle sowie eine Inhibierung der Expression von MHC-Komplexen in primär isolierten Monozyten durch MMF nachgewiesen (Glomsda et al. 2003). Ein Wirkmechanismus über eine BAFF Regulation wurde bisher jedoch nicht untersucht. Insgesamt konnten damit viele verschiedene Immunsupprimierende Effekte von MMF aufgezeigt werden, aber weder in der aktuellen Literatur noch durch die Ergebnisse meiner Studie ließ sich eine Wirkung auf die BAFF Expression nachweisen. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass in meiner Studie sehr kurze Stimulationszeiträume gewählt wurden, im Gegensatz zur klinischen Anwendung, in der durch MMF ein Wirkeintritt erst nach mehreren Wochen erfolgt (Conti et al. 2014). Im Gegensatz zu MMF zeigten Rapamycin und Cyclosporin A in meiner Studie eine deutliche Reduktion der BAFF-Expression auf Proteinebene in Monozyten. Im Off-Label Use der Therapie des SLE zeigte Cyclosporin A vielversprechende Ergebnisse. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass das Immunsuppressivum in der Therapie der Lupusnephritis vergleichbare Ergebnisse wie die Standardtherapie erbrachte (Kamijo et al. 2011; Yang et al. 2014). Cyclosporin A hatte im Gegensatz zu MMF und Rapamycin nur einen geringen Effekt auf die B-Zell-Proliferation und Immunglobulinbildung in vitro (Heidt et al. 2008). Im Mausmodell des SLE wurden durch Rapamycin eine Lebensverlängerung und eine Reduzierung der pathophysiologischen Veränderungen beobachtet (Warner et al. 1994). Weiterhin zeigte sich ein präventiver Effekt auf das Auftreten der Lupusnephritis (Lui et al. 2008). In einer klinischen Studie an Patienten, die an dem SLE erkrankt waren, wurde durch Rapamycin eine Abnahme der Krankheitsaktivität nachgewiesen (Lai et al. 2012; Fernandez et al. 2006). Ebenso führte eine Inhibition von mTOR durch N-Acetylcystein in Patienten mit SLE zu einer Abnahme der Krankheitsaktivität (Lai et al. 2012). Als Wirkmechanismus von Cyclosporin A und Rapamycin wurde eine NF- $\kappa$ B Regulation postuliert. Durch einen NF- $\kappa$ B Inhibitor wurde im Mausmodell für den SLE eine Herunterregulierung von Cytokinen TNF- $\alpha$ , IL-17 und IL-6 detektiert (Qu et al. 2014). Cyclosporin A und Rapamycin zeigen damit vielversprechende Ergebnisse zur Therapie des SLE und anderer Autoimmunerkrankungen. Die herunterregulierende Wirkung der Immunsuppressiva

auf die BAFF-Expression kann durch diese Arbeit postuliert werden, jedoch sind aufgrund der spärlichen Datenlage weitere Studien in vivo und in vitro erforderlich.

Valproinsäure ist ein Histondeacetylaseinhibitor der zu Therapie der Epilepsie, der Migräne, der Schizophrenie und der bipolaren Störung zugelassen ist. In Studien wurden antitumoröse und immunmodulatorische Effekte nachgewiesen (Ichiyama et al. 2000; Duenas-Gonzalez et al. 2008), jedoch ist der genaue Wirkmechanismus noch nicht ausreichend geklärt. In einigen Karzinomen wie dem Multiplen Myelom und der chronisch lymphatischen Leukämie zeigten sich erhöhte BAFF-Serumlevel (Kern et al. 2004; Novak et al. 2004). In Patienten mit B-Zell Non Hodgkin-Lymphomen wurde BAFF im Serum als Prognosemarker postuliert (Oki et al. 2007; Kim et al. 2008). Im Mausmodell des SLE wurde durch Trichostatin A, einem weiteren Histondeacetylaseinhibitor, eine Abnahme der Anti-DNS-Antikörperlevel detektiert (Lu et al. 2005). Des Weiteren zeigen Histondeacetylaseinhibitoren vielversprechende Ergebnisse in der Kombinationstherapie des Non Hodgkin-Lymphoms und des Multiplen Myeloms (Lee et al. 2013; Watanabe 2010). Hinweise auf eine Regulierung des BAFF-Gens durch Histondeacetylaseinhibitoren wurde jedoch nicht beschrieben.

Nicht nur in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen sondern auch in der Transplantationsmedizin spielt BAFF eine tragende Rolle. Patienten die eine allogene Stammzelltransplantation erhalten haben, wiesen erhöhte BAFF-Serumlevel auf (Allen et al. 2012; Sarantopoulos et al. 2007). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass erhöhte BAFF-Serumlevel mit einem erhöhten Risiko der Bildung von Donor spezifischen Antikörpern einhergehen und sich negativ auf die Langzeitfunktion einer Niere nach allogener Nierentransplantation auswirken (Lehnhardt et al. 2012; Thibault-Espitia et al. 2012; Xu et al. 2009). Erhöhte BAFF-Serumlevel vor der Transplantation erhöhen das Risiko der Antikörper vermittelten Abstoßungsreaktion (Banham et al. 2013). In einer Studie an Patienten nach Nierentransplantation und Rituximabtherapie wurden zwar auch erhöhte BAFF Serumlevel detektiert, jedoch konnte kein relevanter Unterschied in der Nierenfunktion der transplantierten Niere nachgewiesen werden. Die erhöhten BAFF Serumlevel sind dabei jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Therapie mit Rituximab zurückzuführen. Da Rituximab zur B-Zelldepletion führt, entfällt die negative Rückkopplung und infolgedessen kommt es zu einer Zunahme des gelösten BAFF (Lehnhardt et al. 2015). Außerdem ist BAFF zur Wiederherstellung des B-Zell-Pools nach Myoablation von großer Bedeutung (Gorelik et al. 2003). Die Wirkung der Immunsuppressiva Cyclosporin A, Rapamycin und Mycophenolatmofetil als weit verbreitete Immunsuppressiva in der Transplantationsmedizin ist auch hier von Interesse. Stark erhöhte BAFF-Serumlevel zeigten sich in einem Follow Up von Patienten, die nach Nierentransplantation mit Alemtuzumab, einem CD 52 Antikörper,

behandelt wurden. In Patienten die eine Erhaltungstherapie mit Calcineurininhibitoren über 2 Jahre erhalten hatten, zeigte sich keine Änderung der BAFF-Serumlevel im Vergleich zu der Patientengruppe die nicht zusätzlich mit Calcineurininhibitoren therapiert wurde. Diese Studie vermutet damit keinen Einfluss von Calcineurininhibitoren auf die BAFF-Expression (Bloom et al. 2009). Rapamycin führte sogar zu erhöhten BAFF-Serumlevel in Patienten die eine Stammzelltransplantation erhalten haben. Rapamycin führte nach drei Monaten zu einer Lymphopenie, nach sechs Monaten wurde ein Anstieg der BAFF Serumlevel detektiert (Jacobson et al. 2014). Es wurde gezeigt, dass BAFF-Serumlevel negativ mit der B-Zell-Zahl korrelieren, da der B-Zell-Pool und die Anzahl an BAFF-Rezeptoren die BAFF-Serumlevel regulieren (Kreuzaler et al. 2012). Es ist also anzunehmen, dass die Zunahme der BAFF-Serumlevel reaktiv auf die Lymphopenie zu werten ist und nicht als direkter Wirkmechanismus von Rapamycin. Gestützt wird diese Annahme durch eine Studie zur Pathogenese der cGvHD, in der bei Abnahme des B- Zell Pools erhöhte BAFF Serumlevel detektiert wurden (Sarantopoulos et al. 2009).

Weitere Studien zur Rolle von BAFF in der Transplantationsmedizin sind zur genaueren Erforschung der Pathogenese der Abstoßungsreaktion und der Interaktion von Immunsuppressiva erforderlich.

Im Jahr 2011 wurde Belimumab als erstes neues Medikament seit 50 Jahren zur Therapie des refraktären weiterhin immunologisch aktiven SLE zugelassen. Belimumab ist ein monoklonaler Antikörper IgG1 der lösliches BAFF neutralisiert. Zwei Phase-III-Studien zeigten, dass Belimumab zusätzlich zur Standardtherapie bei aktivem SLE zu einer Verbesserung des Outcomes im Vergleich zur Standardtherapie alleine führte. Zudem konnte ein Corticoidsparender Effekt und eine Abnahme der Schubfrequenz verzeichnet werden. Die Baseline BAFF-Serumlevel korrelierten dabei nicht mit dem Ansprechen auf die Belimumabtherapie (Ginzler et al. 2014; Manzi et al. 2012; Stohl et al. 2013). In der Therapie der RA befindet sich Belimumab noch in den abschließenden Phase III Studien, jedoch konnte in vorherigen Untersuchungen eine Abnahme pathologischer Autoantikörper und eine Verbesserung der klinischen Symptomatik verzeichnet werden (Jin and Ding 2013; Stohl et al. 2013). Neue Therapieoptionen die das B-Zellkompartiment beeinflussen und dabei BAFF, APRIL und seine Rezeptoren antagonisieren wie z.B. Tabalumab (Manetta et al. 2014) und Atacicept (Isenberg et al. 2015) zeigen vielversprechende Ergebnisse. Diese werden seit einigen Jahren auf deren Wirksamkeit in klinischen Studien verschiedener Erkrankungen überprüft. Die Bedeutung von BAFF in der Pathogenese der Autoimmunerkrankungen wird durch die Studienergebnisse der Biologicals

hervorgehoben. Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse von Belimumab bleibt es in weiteren Studien zu erörtern, welche Patientengruppen besonders von einer Biologicaltherapie profitieren. Die Nebenwirkungen darunter vor allem bakterielle Infektionen wie Zystitis und Bronchitis sowie Übelkeit und Diarrhö waren relativ milde, jedoch liegen noch wenige praktische Erfahrungen und keine Langzeitstudien vor (Ginzler et al. 2014). Im Gegensatz dazu sind das genaue Nebenwirkungsprofil, Interaktionen und Kontraindikationen der untersuchten Immunsuppressiva durch langjährige klinische Erfahrung genau erforscht. Ob Rapamycin und Cyclosporin A auch in vivo die BAFF-Serumlevel herunterregulieren und damit ein neuer Wirkmechanismus beschrieben werden kann, bleibt durch die Arbeit weiterer Studien zu klären. Diese neuen Erkenntnisse könnten das Behandlungsspektrum in Autoimmunerkrankungen und Transplantationsmedizin erweitern, und so die Konzeption neuer Therapieschemata ermöglichen.

#### **4.5 Methodenkritik**

Zur Untersuchung der BAFF Expression wurde die Zelllinie U937 verwendet. Dabei handelt es sich um eine etablierte immortalisierte Lymphomzelllinie, die das Expressionsverhalten eines promonozytischen Entwicklungsstadium widerspiegelt (Sundstrom and Nilsson 1976). Es wurde damit das Verhalten der BAFF-Expression in einem Entwicklungsstadium von Monozyten untersucht, jedoch wurde auf die Bestätigung der Ergebnisse in primär isolierten Monozyten aufgrund aufwendiger Isolierungsprozesse verzichtet. Obwohl ähnliche Zelleigenschaften zwischen myelomonozytischen Zelllinien wie U937 und primär isolierten Monozyten vorliegen gibt es doch einige Unterschiede z.B. in den Reaktionswegen nach Stimulation mit Cytokinen (Gessl et al 1993). Die physiologische Relevanz der Ergebnisse hätte deshalb besonders durch Versuche an primär isolierten Monozyten aufgezeigt werden können. Des Weiteren liegt BAFF vor allem als Homotrimer vor und es handelt sich dabei um den aktiven Liganden. Darüber hinaus kann BAFF als 60 mer vorliegen und so an seinen Rezeptor binden, allerdings wurde das 60 mer nicht durch die verwendeten Antikörper erfasst (Liu et al. 2002; Bossen and Schneider 2006). Die Ergebnisse der FACS-Analyse könnten mit einem methodischen Fehler einhergehen. Es kann schwer sein zwischen dem tatsächlich auftretenden Effekt auf die BAFF-Expression oder einem systematischen Pipettierfehler eines Antikörpers zu unterscheiden. Deshalb wurden zur Minimierung der Fehlerquelle die FACS-Versuche

mindestens dreimal durchgeführt. In dieser Arbeit wurde eine transkriptionelle Modulation und ein Regulationsmechanismus über die Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B und NFAT postuliert. Um diese Annahme zu bekräftigen, wären Untersuchungen der mRNA mittels PCR (Polymerasekettenreaktion) und die genaue Modulation der Transkriptionsfaktoren selbst erforderlich.

## 5. Zusammenfassung/Summary

### Zusammenfassung

Der B-Zell Aktivierende Faktor der Tumornekrosefamilie (BAFF) stellt einen wichtigen Überlebensfaktor für B-Lymphozyten dar. Sowohl bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen als auch bei Patienten nach Allogtransplantation wurden erhöhte BAFF-Serumlevel im Serum detektiert. Es ist mittlerweile gesichert, dass eine Dysregulation von BAFF an der Entstehung und Progression von Autoimmunerkrankungen maßgeblich beteiligt ist. Belimumab, ein BAFF-Antagonist, der seit 2011 in der Therapie des SLE zugelassen ist und vielversprechende Ergebnisse zeigt, unterstreicht dabei die Bedeutung von BAFF in der Pathogenese und Therapie von Autoimmunerkrankungen. Auch in der Transplantationsimmunologie gerät die Rolle der B-Lymphozyten und BAFF ebenfalls immer mehr in den Interessenfokus der Forschung. Zur Prophylaxe der Abstoßungsreaktion nach Transplantation sowie zur Therapie von Autoimmunerkrankungen werden verschiedene Immunsuppressiva eingesetzt deren Wirkmechanismen jedoch nicht vollständig geklärt sind. In dieser Studie soll untersucht werden, ob die Immunsuppressiva Rapamycin, Cyclosporin A, Methotrexat, Mycophenolatmofetil und der Immunmodulator Valproinsäure zu einer Modulation von BAFF führen. Dazu wurde die BAFF-Expression auf zytoplasmatischer und membranständiger Proteinebene in Monozyten, dem Hauptproduzenten des Zytokins mittels FACS-Analyse untersucht. Zudem wurde die Sekretion von löslichem BAFF mittels ELISA in den Zellüberständen gemessen. Die Immunsuppressiva Methotrexat, Mycophenolatmofetil und Valproinsäure zeigten keine relevante gleichgerichtete Modulation von BAFF auf zytoplasmatischer und membrangebundener Proteinebene sowie auf das Sekretionsverhalten von löslichem BAFF. Ein neuer Wirkmechanismus über die Regulierung von BAFF konnte damit durch diese drei Immunsuppressiva nicht aufgezeigt werden. Hingegen wurde sowohl durch Rapamycin als auch durch Cyclosporin A eine signifikante Abnahme der zytoplasmatischen und membrangebundenen BAFF-Expression nachgewiesen. Des Weiteren wurde die BAFF-Freisetzung in den Kulturüberständen durch beide Immunsuppressiva signifikant reduziert. Da BAFF eine Konsensussequenz für die Transkriptionsfaktoren NFAT und NFκB aufweist, ist es möglich dass Rapamycin und Cyclosporin A über diese Transkriptionsfaktoren BAFF herunterregulieren. Durch die Ergebnisse meiner Studie kann für die Immunsuppressiva Cyclosporin A und Rapamycin ein neuer

Wirkmechanismus über die Suppression von BAFF postuliert werden. Um den genauen Regulationsmechanismus zu klären und zur Bestätigung der Ergebnisse in vitro und in vivo sind jedoch noch weitere Untersuchungen erforderlich. Diese neuen Erkenntnisse könnten die Konzeption neuer Therapieschemata zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen und in der Therapie der Abstoßungsreaktion nach Transplantation ermöglichen.

### **Summary**

The B-cell activating factor of the tumour necrosis family (BAFF) represents an essential survival factor for B cells. Increased BAFF serum levels have been detected both in patients with autoimmune diseases and in patients post allotransplant. It is certain that dysregulation of BAFF plays a significant role in the generation and progression of autoimmune diseases and the BAFF antagonist Belilumab is effective in the treatment of SLE. In transplantation immunology and in autoimmunity BAFF is increasingly important as a possible treatment target. In this study we examined the effects of the immunosuppressants rapamycin, cyclosporin A, methotrexate, mycophenolate mofetil and the immunomodulator valproic acid on BAFF expression and release. The immunosuppressants methotrexate, mycophenolate mofetil and valproic acid showed no effect on BAFF on the cytoplasmic or membrane-bound BAFF or the release of BAFF. In contrast, rapamycin and cyclosporine induced a significant reduction of cytoplasmic and membrane-bound BAFF expression. Moreover, the BAFF release was significantly reduced. Since BAFF shows a consensus sequence for the transcription factors NFAT and NF $\kappa$ B, it is possible that rapamycin and cyclosporin A downregulate BAFF via these transcription factors. The results of my study indicate that a new mechanism for the immunosuppressants cyclosporin A and rapamycin via suppression of BAFF may be possible. However, further tests are necessary for the identification of the underlying mechanism and confirmation of results in vivo.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

APRIL	<i>engl. : a proliferation inducing ligand</i>
BAFF	B-Zell aktivierender Faktor der Tumornekrosefamilie
BAFF-R	BAFF-Rezeptor
BCMA	<i>engl.: B cell maturation antigen</i>
Blys	<i>engl.: B lymphozyt stimulator</i>
CDR	Cysteinreiche Domäne
CD	<i>engl.: cluster of differentiation</i>
CD40L	<i>engl.: cluster of differentiation 40 ligand</i>
cGvHd	<i>engl.: chronic graft-versus-host disease</i>
CsA	Cyclosporin A
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	<i>engl.: enzyme linked immunosorbent assay</i>
ERK	Extracellular signal regulated protein kinase
FACS	<i>engl.: fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>engl.: fetal calf serum</i>
FSC	<i>engl.: forward scatter</i>
FKBP12	FK506 bindendes Protein 12
GABA	<i>engl.: <math>\gamma</math>-Aminobuttersäure</i>
G-CSF	<i>engl.: granulocyte colony-stimulating factor</i>
HDACI	Histondeacetylaseinhibitor
HLA	<i>engl.: human leucocyte antigen</i>
HRP	<i>engl.: horseradish peroxidase</i>
Ig	Immunglobulin
IFN	Interferon
I $\kappa$ B	Inhibitor of $\kappa$ B
I $\kappa$ K	I $\kappa$ B Kinase Komplex
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	<i>(engl.: macrophage chemotactic protein)</i>
MIP1- $\alpha$	<i>(engl.: macrophage inflammatory protein)</i>
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MHC	<i>engl.: major histocompatibility complex</i>
m-TOR	<i>engl.: mammalian target of rapamycin</i>
Mtx	Methotrexat
MMF	Mycophenolatmofetil
NET	neutrophil extracellular traps
NFAT	<i>engl.: nuclear factor of activated T-cells</i>
NF $\kappa$ B	<i>engl.: nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PP2A	Proteinphosphatase 2 A
RA	Rheumatoide Arthritis
SLE	Systemische Lupus erythematoses
SS	Sjögren Syndrom
SSC	<i>engl.: sideward scatter</i>
TACI	<i>engl.: transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor</i>
TALL-1	<i>engl.: TNF- and ApoL-related leukocyte-expressed ligand 1</i>
THANK	<i>engl.: TNF Homologue That Activates Apoptosis, Nuclear</i>

THD	<i>Factor-<math>\kappa</math>B and c-Jun NH2 Terminal Kinase</i>
TNF	<i>TNF-Homologie Domäne</i>
TNSF 13b	<i>Tumornekrosefaktor</i>
TRAF	<i>engl.: TNF Superfamily Member 13b</i>
VPA	<i>engl.: TNF-receptor associated factor</i>
WST	<i>Valproinsäure</i>
zTNF4	<i>engl.: Water soluble tetrazolium salt</i>
	<i>engl.: z-tumor necrosis factor 4</i>

## 7. Abbildungsverzeichnis

**Abb. 1:** Die Interaktion von BAFF mit seinen Rezeptoren und ihre Funktion im Immunsystem. Grafik modifiziert nach Schneider et al (2003), erstellt mit [www.proteinlounge.com](http://www.proteinlounge.com)

**Abb. 2:** Die Rolle von BAFF in der negativen Selektion von B-Zellen und die Entstehung von Autoimmunität. Grafik modifiziert nach Mackay und Browning (2002), erstellt mit [www.proteinlounge.com](http://www.proteinlounge.com).

**Abb. 3:** Wirkungsmechanismen der Immunsuppressiva Rapamycin und Cyclosporin A. Grafik modifiziert nach Resch, Klaus, Immunpharmakologie, Stuttgart 2010, erstellt mit [www.proteinlounge.com](http://www.proteinlounge.com)

**Abb. 4:** Neubauer improved Zählkammer.

Bildquelle:

[http://www.brand.de/fileadmin/user/pdf/GK900/Zaehlkammern/GK900\\_05\\_Clinical\\_Lab\\_Zaehlkammern\\_d.pdf](http://www.brand.de/fileadmin/user/pdf/GK900/Zaehlkammern/GK900_05_Clinical_Lab_Zaehlkammern_d.pdf)

Stand: 05.06.2017

**Abb. 5:** Reaktion von Tetrazolium zu Formazan durch die mitochondriale Succinatdehydrogenase.

Bildquelle:

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/CELLPRORO?lang=de&region=DE>

Stand:05.06.2017

**Abb. 6:** Schematische Darstellung des Strahlengangs durch ein FACS Calibur-Durchflusszytometer.

Bildquelle:

[http://www.bdbiosciences.com/sg/wcmimages/facscalibur\\_features\\_opticalpath.jpg](http://www.bdbiosciences.com/sg/wcmimages/facscalibur_features_opticalpath.jpg)

Stand 05.06.2017

**Abb. 7:** Abnahme der intrazellulären BAFF-Expression in Monozyten nach Stimulation mit Rapamycin.

**Abb 8.:** Beispielhaftes Histogramm zur Darstellung der Fluoreszenzintensitäten nach Stimulation mit Rapamycin.

**Abb. 9:** Herunterregulierung der intrazellulären BAFF-Expression in Monozyten durch Cyclosporin A.

**Abb. 10:** Regulierung der intrazellulären BAFF-Expression in Monozyten nach Stimulation mit Methotrexat nach 24, 48 und 72h.

**Abb. 11:** Valproinsäure resultiert in einer Abnahme der intrazellulären BAFF-Konzentration in Monozyten.

**Abb. 12:** Die intrazelluläre BAFF-Expression wird durch Mycophenolatmofetil in Monozyten nicht beeinflusst.

**Abb. 13:** Rapamycin führte in Monozyten zu einer Herabsetzung der membrangebundenen BAFF-Expression.

**Abb. 14:** Abnahme der membranständigen BAFF-Expression in Monozyten durch Cyclosporin A.

**Abb. 15:** Verringerung der membranständigen BAFF-Expression durch Methotrexat.

**Abb. 16:** Valproinsäure resultiert in einer Herunterregulierung der membranständigen BAFF-Expression.

**Abb. 17:** Mycophenolatmofetil zeigte keinen Effekt auf die membrangebundene BAFF-Expression in Monozyten.

**Abb. 18:** Herabsetzung der löslichen, freigesetzten BAFF-Konzentration durch Rapamycin in Monozyten.

**Abb. 19:** Cyclosporin A resultiert in einer Abnahme der BAFF-Freisetzung in Monozyten.

**Abb. 20:** Herunterregulierung der BAFF-Sekretion in Monozyten durch Methotrexat.

**Abb. 21:** Durch Valproinsäure kommt es zu keiner Veränderung der BAFF-Freisetzung in Monozyten.

**Abb. 22:** Mycophenolatmofetil zeigt keinen Einfluss auf die BAFF-Freisetzung.

**Abb. 23:** Rapamycin zeigt keinen Einfluss auf die Viabilität von Monozyten.

**Abb. 24:** Cyclosporin A führt zu keiner Abnahme der Zellviabilität in Monozyten.

**Abb. 25:** Valproinsäure wirkt nicht cytotoxisch auf Monozyten.

**Abb. 26:** Nach Stimulation mit Methotrexat ist eine Reduzierung der metabolisch aktiven Zellen nachweisbar.

**Abb. 27:** Mycophenolatmofetil führt zu einer Reduktion der Zellviabilität in Monozyten.

## 8. Tabellenverzeichnis

**Tab. 1:** Stimuli mit den jeweils verwendeten Konzentrationen und Lösungsmitteln

**Tab. 2:** Für die Durchflusszytometrie verwendete Antikörper und Isotypen und deren Verdünnungen

**Tab. 3:** Wirkung von Immunsuppressiva auf die intrazelluläre BAFF-Expression - Übersicht der Resultate

**Tab. 4:** Wirkung von Immunsuppressiva auf die membrangebundene BAFF-Expression, -Übersicht der Resultate

**Tab. 5:** Wirkung von Immunsuppressiva auf die BAFF-Freisetzung, -Übersicht der Resultate

## 9. Literaturverzeichnis

- Adcock, I. M.** (2007). "HDAC inhibitors as anti-inflammatory agents." Br J Pharmacol **150**(7): 829-31.
- Adcock, I. M.** and G. Caramori (2001). "Cross-talk between pro-inflammatory transcription factors and glucocorticoids." Immunol Cell Biol **79**(4): 376-84.
- Aggarwal, B. B.** (2003). "Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword." Nat Rev Immunol **3**(9): 745-56.
- Allen, J. L., M. S. Fore, et al.** (2012) "B cells from patients with chronic GVHD are activated and primed for survival via BAFF-mediated pathways." Blood **120**(12): 2529-36.
- Allison, A. C.** and E. M. Eugui (2000). "Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action." Immunopharmacology **47**(2-3): 85-118.
- Arasa, J., P. Martos, et al.** (2014) "Topical application of the adenosine A2A receptor agonist CGS-21680 prevents phorbol-induced epidermal hyperplasia and inflammation in mice." Exp Dermatol **23**(8): 555-60.
- Augustine, J. J., K. A. Bodziak, et al.** (2007). "Use of sirolimus in solid organ transplantation." Drugs **67**(3): 369-91.
- Bach, J. F.** (1994). "Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease." Endocr Rev **15**(4): 516-42.
- Banham, G., D. Prezzi, et al.** (2013) "Elevated pretransplantation soluble BAFF is associated with an increased risk of acute antibody-mediated rejection." Transplantation **96**(4): 413-20.
- Bannish, G., E. M. Fuentes-Panana, et al.** (2001). "Ligand-independent signaling functions for the B lymphocyte antigen receptor and their role in positive selection during B lymphopoiesis." J Exp Med **194**(11): 1583-96.
- Batten, M., J. Groom, et al.** (2000). "BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes." J Exp Med **192**(10): 1453-66.
- Becker-Merok, A., C. Nikolaisen, et al.** (2006). "B-lymphocyte activating factor in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in relation to autoantibody levels, disease measures and time." Lupus **15**(9): 570-6.
- Bennett, W. M.** and D. J. Norman (1986). "Action and toxicity of cyclosporine." Annu Rev Med **37**: 215-24.
- Bertino, J. R., M. Levitt, et al.** (1971). "New approaches to chemotherapy with folate antagonists: use of leucovorin "rescue" and enzymic folate depletion." Ann N Y Acad Sci **186**: 486-95.
- Bick, S.** (2011) Untersuchung der Modulation von Expression und Freisetzung des B-Zell aktivierenden Faktors BAFF in Monozyten, unv. Diss, Universität Giessen
- Bick, S., M. Tschernatsch, et al.** (2013) "Intravenous immunoglobulin inhibits BAFF production in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy - a new mechanism of action?" J Neuroimmunol **256**(1-2): 84-90.
- Bleyer, W. A.** (1978). "The clinical pharmacology of methotrexate: new applications of an old drug." Cancer **41**(1): 36-51.
- Bloom, D., Z. Chang, et al.** (2009). "BAFF is increased in renal transplant patients following treatment with alemtuzumab." Am J Transplant **9**(8): 1835-45.
- Bode, K. A., K. Schroder, et al.** (2007). "Histone deacetylase inhibitors decrease Toll-like receptor-mediated activation of proinflammatory gene expression by impairing transcription factor recruitment." Immunology **122**(4): 596-606.
- Bodmer, J. L., P. Schneider, et al.** (2002). "The molecular architecture of the TNF superfamily." Trends Biochem Sci **27**(1): 19-26.
- Bohm, I.** (2003). "Decrease of B-cells and autoantibodies after low-dose methotrexate." Biomed Pharmacother **57**(7): 278-81.

- Bolkun, L., D. Lemancewicz, et al. (2015)** "The impact of TNF superfamily molecules on overall survival in acute myeloid leukaemia: correlation with biological and clinical features." Ann Hematol **94**(1): 35-43.
- Bosello, S., P. Youinou, et al. (2008)**. "Concentrations of BAFF correlate with autoantibody levels, clinical disease activity, and response to treatment in early rheumatoid arthritis." J Rheumatol **35**(7): 1256-64.
- Bossen, C., T. G. Cachero, et al. (2008)**. "TACI, unlike BAFF-R, is solely activated by oligomeric BAFF and APRIL to support survival of activated B cells and plasmablasts." Blood **111**(3): 1004-12.
- Bossen, C. and P. Schneider (2006)**. "BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling." Semin Immunol **18**(5): 263-75.
- Bradley, J. and C. J. Elson (1971)**. "Suppression of the immune response." J Med Genet **8**(3): 321-40.
- Breitkreutz, I., M. S. Raab, et al. (2007)**. "Targeting MEK1/2 blocks osteoclast differentiation, function and cytokine secretion in multiple myeloma." Br J Haematol **139**(1): 55-63.
- Burek, C. L. and N. R. Rose (2008)**. "Autoimmune thyroiditis and ROS." Autoimmun Rev **7**(7): 530-7.
- Cachero, T. G., I. M. Schwartz, et al. (2006)**. "Formation of virus-like clusters is an intrinsic property of the tumor necrosis factor family member BAFF (B cell activating factor)." Biochemistry **45**(7): 2006-13.
- Cancro, M. P. (2004)**. "The BLYS family of ligands and receptors: an archetype for niche-specific homeostatic regulation." Immunol Rev **202**: 237-49.
- Cantley, M. D., D. P. Fairlie, et al. (2015)** "Inhibiting histone deacetylase 1 suppresses both inflammation and bone loss in arthritis." Rheumatology (Oxford) **54**(9): 1713-23.
- Carreno, B. M. and M. Collins (2002)**. "The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses." Annu Rev Immunol **20**: 29-53.
- Carswell, E. A., L. J. Old, et al. (1975)**. "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(9): 3666-70.
- Castigli, E., S. A. Wilson, et al. (2005)**. "TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells." J Exp Med **201**(1): 35-9.
- Chang, S. K., B. K. Arendt, et al. (2006)**. "A role for BLYS in the activation of innate immune cells." Blood **108**(8): 2687-94.
- Chaplin, D. D. (2006)**. "1. Overview of the human immune response." J Allergy Clin Immunol **117**(2 Suppl Mini-Primer): S430-5.
- Cheema, G. S., V. Roschke, et al. (2001)**. "Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases." Arthritis Rheum **44**(6): 1313-9.
- Chen, L., G. Huang, et al (2017)** Chiroic acid suppresses BAFF expression in B lymphocytes by inhibiting NF- $\kappa$ B activity. Int Immunopharmacol. **44**:211-215
- Cheng, C. C., Y. F. Lee, et al. (2013)** "Mycophenolate mofetil alleviates lupus nephritis through urokinase receptor signaling in a mice model." Lupus **22**(6): 554-61.
- Chung, J. Y., Y. C. Park, et al. (2002)**. "All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction." J Cell Sci **115**(Pt 4): 679-88.
- Collins, C. E., M. Dall'Era, et al. (2016)** "Response to belimumab among patients with systemic lupus erythematosus in clinical practice settings: 24-month results from the OBSERVE study in the USA." Lupus Sci Med **3**(1): e000118.
- Colonna, L., C. Lood, et al. (2014)** "Beyond apoptosis in lupus." Curr Opin Rheumatol **26**(5): 459-66.
- Colvin, R. B. (2007)**. "Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis." J Am Soc Nephrol **18**(4): 1046-56.
- Conrad, B., E. Weidmann, et al. (1994)**. "Evidence for superantigen involvement in insulin-dependent diabetes mellitus aetiology." Nature **371**(6495): 351-5.

- Conti, F., F. Ceccarelli, et al. (2014)** "Mycophenolate mofetil in systemic lupus erythematosus: results from a retrospective study in a large monocentric cohort and review of the literature." Immunol Res **60**(2-3): 270-6.
- Cronstein, B. N. (2005).** "Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis." Pharmacol Rev **57**(2): 163-72.
- Cutolo, M., A. Sulli, et al. (2001).** "Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis **60**(8): 729-35.
- Dan, H. C., M. J. Cooper, et al. (2008).** "Akt-dependent regulation of NF- $\kappa$ B is controlled by mTOR and Raptor in association with IKK." Genes Dev **22**(11): 1490-500.
- Daridon, C., V. Devauchelle, et al. (2007).** "Aberrant expression of BAFF by B lymphocytes infiltrating the salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome." Arthritis Rheum **56**(4): 1134-44.
- Degertekin, M., E. Regar, et al. (2002).** "Sirolimus eluting stent in the treatment of atherosclerosis coronary artery disease." Minerva Cardioangiol **50**(5): 405-18.
- De Vita S., L. Quartuccio et al. (2015).** "Efficacy and safety of belimumab given for 12 months in primary Sjögren's syndrome: the BELISS open-label phase II study." Rheumatology (Oxford) **54**(12): 2249-56
- Dillon, S. R., J. A. Gross, et al. (2006).** "An APRIL to remember: novel TNF ligands as therapeutic targets." Nat Rev Drug Discov **5**(3): 235-46.
- Doxiadis (2012)** "Compatibility and kidney transplantation: the way to go." Front Immunol **3**: 111.
- Duenas-Gonzalez, A., M. Candelaria, et al. (2008).** "Valproic acid as epigenetic cancer drug: preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors." Cancer Treat Rev **34**(3): 206-22.
- Edwards A. J. P., Pender S. L. F. (2011)** "Histone deacetylase inhibitors and their potential role in inflammatory bowel diseases." Biochemical Society Transactions ;**39** (4):1092–1095.
- Encke, J., W. Uhl, et al. (2004).** "Immunosuppression and modulation in liver transplantation." Nephrol Dial Transplant **19 Suppl 4**: iv22-5.
- Epinette, W. W., C. M. Parker, et al. (1987).** "Mycophenolic acid for psoriasis. A review of pharmacology, long-term efficacy, and safety." J Am Acad Dermatol **17**(6): 962-71.
- Ermann, J. and C. G. Fathman (2001).** "Autoimmune diseases: genes, bugs and failed regulation." Nat Immunol **2**(9): 759-61.
- Fabre, C., J. Grosjean, et al. (2008).** "A novel effect of DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors: NF $\kappa$ B inhibition in malignant myeloblasts." Cell Cycle **7**(14): 2139-45.
- Faulds, D., K. L. Goa, et al. (1993).** "Cyclosporin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in immunoregulatory disorders." Drugs **45**(6): 953-1040.
- Fernandez, D., E. Bonilla, et al. (2006).** "Rapamycin reduces disease activity and normalizes T cell activation-induced calcium fluxing in patients with systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **54**(9): 2983-8.
- Fortin, P. R., M. Abrahamowicz, et al. (2008).** "Steroid-sparing effects of methotrexate in systemic lupus erythematosus: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial." Arthritis Rheum **59**(12): 1796-804.
- Fragioudaki, M., G. Tsirakis, et al. (2012)** "Serum BAFF levels are related to angiogenesis and prognosis in patients with multiple myeloma." Leuk Res **36**(8): 1004-8.
- Frantz, B., E. C. Nordby, et al. (1994).** "Calcineurin acts in synergy with PMA to inactivate I kappa B/MAD3, an inhibitor of NF-kappa B." EMBO J **13**(4): 861-70.
- Frikeche, J., T. Simon, et al. (2012)** "Impact of valproic acid on dendritic cells function." Immunobiology **217**(7): 704-10.
- Fu, L., Y. C. Lin-Lee, et al. (2006).** "Constitutive NF-kappaB and NFAT activation leads to stimulation of the BLyS survival pathway in aggressive B-cell lymphomas." Blood **107**(11): 4540-8.

- Fu, L., Y. C. Lin-Lee, et al. (2009).** "BAFF-R promotes cell proliferation and survival through interaction with IKKbeta and NF-kappaB/c-Rel in the nucleus of normal and neoplastic B-lymphoid cells." Blood **113**(19): 4627-36.
- Fujinami, R. S. and M. B. Oldstone (1985).** "Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity." Science **230**(4729): 1043-5.
- Gao, S., W. Liu, et al. (2015)** "The Activation of mTOR is Required for Monocyte Proinflammatory Response in Patients with Coronary Artery Disease." Clin Sci (Lond).
- Gavin, A. L., D. Ait-Azzouzene, et al. (2003).** "DeltaBAFF, an alternate splice isoform that regulates receptor binding and biopresentation of the B cell survival cytokine, BAFF." J Biol Chem **278**(40): 38220-8.
- Gerber, N., A. von Felten, et al. (1977).** "[Ankylosing spondylitis (Bechterew) and tissue antigen HLA-B27. III, Heredity of ankylosing spondylitis (Bechterew)]." Z Rheumatol **36**(7-8): 230-8.
- Gessl, A., et al. (1993).** "Tumour necrosis factor-alpha augments the expression of Fc IgE receptor (Fc epsilon RII/CD23) on human monocytic cell lines and down-regulates interleukin-4-driven Fc epsilon RII expression on monocytes." Immunology **78**(3): 476-81.
- Gheita, T. A., I. H. Bassyouni, et al.(2012)** "Elevated BAFF (BLyS) and APRIL in Juvenile idiopathic arthritis patients: relation to clinical manifestations and disease activity." Joint Bone Spine **79**(3): 285-90.
- Gibbons, J. J., R. T. Abraham, et al. (2009).** "Mammalian target of rapamycin: discovery of rapamycin reveals a signaling pathway important for normal and cancer cell growth." Semin Oncol **36 Suppl 3**: S3-S17.
- Ginzler, E. M., D. J. Wallace, et al. (2014)**"Disease control and safety of belimumab plus standard therapy over 7 years in patients with systemic lupus erythematosus." J Rheumatol **41**(2): 300-9.
- Glaesener, S., T. D. Quach, et al. (2014)** "Distinct effects of methotrexate and etanercept on the B cell compartment in patients with juvenile idiopathic arthritis." Arthritis Rheumatol **66**(9): 2590-600.
- Glicklich, D. and A. Acharya (1998).** "Mycophenolate mofetil therapy for lupus nephritis refractory to intravenous cyclophosphamide." Am J Kidney Dis **32**(2): 318-22.
- Glomsda, B. A., R. A. Blaheta, et al. (2003).** "Inhibition of monocyte/endothelial cell interactions and monocyte adhesion molecule expression by the immunosuppressant mycophenolate mofetil." Spinal Cord **41**(11): 610-9.
- Go, H. S., J. E. Seo, et al. (2011)**"Valproic acid inhibits neural progenitor cell death by activation of NF-kappaB signaling pathway and up-regulation of Bcl-XL." J Biomed Sci **18**(1): 48.
- Goldblum, R. (1993).** "Therapy of rheumatoid arthritis with mycophenolate mofetil." Clin Exp Rheumatol **11 Suppl 8**: S117-9.
- Gorelik, L., A. H. Cutler, et al. (2004).** "Cutting edge: BAFF regulates CD21/35 and CD23 expression independent of its B cell survival function." J Immunol **172**(2): 762-6.
- Gorelik, L., K. Gilbride, et al. (2003).** "Normal B cell homeostasis requires B cell activation factor production by radiation-resistant cells." J Exp Med **198**(6): 937-45.
- Gottlicher, M., S. Minucci, et al. (2001).** "Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells." EMBO J **20**(24): 6969-78.
- Groom, J., S. L. Kalled, et al. (2002).** "Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjogren's syndrome." J Clin Invest **109**(1): 59-68.
- Groom, J. R., C. A. Fletcher, et al. (2007).** "BAFF and MyD88 signals promote a lupuslike disease independent of T cells." J Exp Med **204**(8): 1959-71.
- Gross, J. A., J. Johnston, et al. (2000).** "TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease." Nature **404**(6781): 995-9.
- Gualberto, A., G. Marquez, et al. (1998).** "p53 transactivation of the HIV-1 long terminal repeat is blocked by PD 144795, a calcineurin-inhibitor with anti-HIV properties." J Biol Chem **273**(12): 7088-93.

- Gupta, A. K., S. Giaglis, et al. (2014)** "Efficient neutrophil extracellular trap induction requires mobilization of both intracellular and extracellular calcium pools and is modulated by cyclosporine A." PLoS One **9**(5): e97088.
- Han, Y., Q. Jing, et al. (2009)**. "Safety and efficacy of biodegradable polymer-coated sirolimus-eluting stents in "real-world" practice: 18-month clinical and 9-month angiographic outcomes." JACC Cardiovasc Interv **2**(4): 303-9.
- Hase, H., Y. Kanno, et al. (2004)**. "BAFF/BLyS can potentiate B-cell selection with the B-cell coreceptor complex." Blood **103**(6): 2257-65.
- Hauser, R. A., A. R. Malek, et al. (1998)**. "Successful treatment of a patient with severe refractory myasthenia gravis using mycophenolate mofetil." Neurology **51**(3): 912-3.
- Heidt, S., D. L. Roelen, et al. (2008)**. "Effects of immunosuppressive drugs on purified human B cells: evidence supporting the use of MMF and rapamycin." Transplantation **86**(9): 1292-300.
- Hsu, B. L., S. M. Harless, et al. (2002)**. "Cutting edge: BLyS enables survival of transitional and mature B cells through distinct mediators." J Immunol **168**(12): 5993-6.
- Hui-Yuen, J. S., X. Q. Li, et al. (2015)** "Belimumab in systemic lupus erythematosus: a perspective review." Ther Adv Musculoskelet Dis **7**(4): 115-21.
- Hull, E. E., M. R. Montgomery, et al. (2016)** "HDAC Inhibitors as Epigenetic Regulators of the Immune System: Impacts on Cancer Therapy and Inflammatory Diseases." Biomed Res Int **2016**: 8797206.
- Ichiyama, T., K. Okada, et al. (2000)**. "Sodium valproate inhibits production of TNF-alpha and IL-6 and activation of NF-kappaB." Brain Res **857**(1-2): 246-51.
- Ichiyama, T., Y. Ueno, et al. (2004)**. "An immunoglobulin agent (IVIG) inhibits NF-kappaB activation in cultured endothelial cells of coronary arteries in vitro." Inflamm Res **53**(6): 253-6.
- Isenberg, D., C. Gordon, et al. (2015)** "Efficacy and safety of ataccept for prevention of flares in patients with moderate-to-severe systemic lupus erythematosus (SLE): 52-week data (APRIL-SLE randomised trial)." Ann Rheum Dis.
- Jacobson, C. A., L. Sun, et al. (2014)** "Post-transplantation B cell activating factor and B cell recovery before onset of chronic graft-versus-host disease." Biol Blood Marrow Transplant **20**(5): 668-75.
- Janeway, C. A., Jr. (2001)**. "How the immune system protects the host from infection." Microbes Infect **3**(13): 1167-71.
- Jensen, L. O., P. Thayssen, et al. (2016)** "Safety and Efficacy of Everolimus- Versus Sirolimus-Eluting Stents: 5-Year Results From SORT OUT IV." J Am Coll Cardiol **67**(7): 751-62.
- Jin, X. and C. Ding (2013)** "Belimumab--an anti-BLyS human monoclonal antibody for rheumatoid arthritis." Expert Opin Biol Ther **13**(2): 315-22.
- Johannessen, C. U. (2000)**. "Mechanisms of action of valproate: a commentary." Neurochem Int **37**(2-3): 103-10.
- Jonsson, C. A. and H. Carlsten (2001)**. "Inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) inhibition in vitro suppresses lymphocyte proliferation and the production of immunoglobulins, autoantibodies and cytokines in splenocytes from MRLlpr/lpr mice." Clin Exp Immunol **124**(3): 486-91.
- Kahan, B. D. (1989)**. "Cyclosporine." N Engl J Med **321**(25): 1725-38.
- Kalled, S. L., C. Ambrose, et al. (2005)**. "The biochemistry and biology of BAFF, APRIL and their receptors." Curr Dir Autoimmun **8**: 206-42.
- Kamijo, Y., K. Hashimoto, et al. (2011)** "Treatment with cyclosporine A improves SLE disease activity of Japanese patients with diffuse proliferative lupus nephritis." Clin Nephrol **76**(2): 136-43.
- Kang, J. S., Y. D. Yoon, et al. (2006)**. "B cell-activating factor is a novel diagnosis parameter for asthma." Int Arch Allergy Immunol **141**(2): 181-8.
- Kaplan, M. (1998)**. "Primary biliary cirrhosis." Lancet **351**(9097): 216.
- Karim, M. Y., P. Alba, et al. (2002)**. "Mycophenolate mofetil for systemic lupus erythematosus refractory to other immunosuppressive agents." Rheumatology (Oxford)

41(8): 876-82.

**Karin, M.** and A. Lin (2002). "NF-kappaB at the crossroads of life and death." Nat Immunol **3**(3): 221-7.

**Kassel, O.** and P. Herrlich (2007). "Crosstalk between the glucocorticoid receptor and other transcription factors: molecular aspects." Mol Cell Endocrinol **275**(1-2): 13-29.

**Kato, A., A. Peters, et al.** (2008). "Evidence of a role for B cell-activating factor of the TNF family in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis with nasal polyps." J Allergy Clin Immunol **121**(6): 1385-92, 1392 e1-2.

**Kern, C., J. F. Cornuel, et al.** (2004). "Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway." Blood **103**(2): 679-88.

**Khare, S. D., I. Sarosi, et al.** (2000). "Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3370-5.

**Kim, J. Y., Y. Yang, et al.** (2008). "Serum BAFF expression in patients with myasthenia gravis." J Neuroimmunol **199**(1-2): 151-4.

**Kim, S. J., S. J. Lee, et al.** (2008). "Serum BAFF predicts prognosis better than APRIL in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab plus CHOP chemotherapy." Eur J Haematol **81**(3): 177-84.

**Kim, Y., J. S. Moon, et al.** (2004). "Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin mediates the expression of iNOS through IKK and NF-kappaB activity in LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages and RAW 264.7 cells." Biochem Biophys Res Commun **314**(3): 695-703.

**Kissmeyer-Nielsen, F., S. Olsen, et al.** (1966). "Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells." Lancet **2**(7465): 662-5.

**Klinman, D. M.** (1989). "Recent advances in systemic lupus erythematosus." Curr Opin Immunol **1**(4): 740-6.

**Kremer, J. M.** (1994). "The mechanism of action of methotrexate in rheumatoid arthritis: the search continues." J Rheumatol **21**(1): 1-5.

**Kreuzaler, M., M. Rauch, et al.** (2012) "Soluble BAFF levels inversely correlate with peripheral B cell numbers and the expression of BAFF receptors." J Immunol **188**(1): 497-503.

**Krumbholz, M., U. Specks, et al.** (2005). "BAFF is elevated in serum of patients with Wegener's granulomatosis." J Autoimmun **25**(4): 298-302.

**Krumbholz, M., D. Theil, et al.** (2005). "BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma." J Exp Med **201**(2): 195-200.

**Kutkuhn, B., M. Hollenbeck, et al.** (1997). "Development of insulin resistance and elevated blood pressure during therapy with cyclosporine A." Blood Press **6**(1): 13-7.

**Lai, Z. W., R. Hanczko, et al.** (2012) "N-acetylcysteine reduces disease activity by blocking mammalian target of rapamycin in T cells from systemic lupus erythematosus patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial." Arthritis Rheum **64**(9): 2937-46.

**Lanteri, A., V. Sobanski, et al.** (2014) "Serum free light chains of immunoglobulins as biomarkers for systemic sclerosis characteristics, activity and severity." Autoimmun Rev **13**(9): 974-80.

**Lee, H. C., J. J. Shah, et al.** (2013) "Novel approaches to treatment of double-refractory multiple myeloma." Am Soc Clin Oncol Educ Book.

**Lee, J., M. S. Kim, et al.** (2008). "Mycophenolate mofetil promotes down-regulation of expanded B cells and production of TNF-alpha in an experimental murine model of colitis." Cytokine **44**(1): 49-56.

**Lee, J. I. and G. J. Burckart** (1998). "Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target." J Clin Pharmacol **38**(11): 981-93.

**Lehnhardt, A., F. Dunst, et al.** (2012) "Elevated serum levels of B-cell activating factor in pediatric renal transplant patients." Pediatr Nephrol **27**(8): 1389-95.

**Lehnhardt, A. M., M. Strecker, et al.** (2015) "High B-cell activating factor is not

- associated with worse 3-year graft outcome in blood group-incompatible kidney transplantation with rituximab induction." Clin Transplant **29**(4): 359-64.
- Leoni, F., A. Zaliani, et al.** (2002). "The antitumor histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid exhibits antiinflammatory properties via suppression of cytokines." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(5): 2995-3000.
- Liang D, Zeng Q, Xu Z, et al** (2014) BAFF activates Erk1/2 promoting cell proliferation and survival by Ca<sup>2+</sup>-CaMKII-dependent inhibition of PP2A in normal and neoplastic B-lymphoid cells. Biochem Pharmacol 87:332–343
- Lieberthal, W. and J. S. Levine** (2009). "The role of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in renal disease." J Am Soc Nephrol **20**(12): 2493-502.
- Lin, H., K. T. Chang, et al.** (2014) "Effects of the mTOR inhibitor Rapamycin on Monocyte-Secreted Chemokines." BMC Immunol **15**(1): 37.
- Lin, R. H., M. J. Mamula, et al.** (1991). "Induction of autoreactive B cells allows priming of autoreactive T cells." J Exp Med **173**(6): 1433-9.
- Litinskiy, M. B., B. Nardelli, et al.** (2002). "DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL." Nat Immunol **3**(9): 822-9.
- Liu, Y., L. Xu, et al.** (2002). "Crystal structure of sTALL-1 reveals a virus-like assembly of TNF family ligands." Cell **108**(3): 383-94.
- Liu, Z. and A. Davidson** (2011) "BAFF inhibition: a new class of drugs for the treatment of autoimmunity." Exp Cell Res **317**(9): 1270-7.
- Loewith, R., E. Jacinto, et al.** (2002). "Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control." Mol Cell **10**(3): 457-68.
- Loscher, W.** (1999). "Valproate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action." Prog Neurobiol **58**(1): 31-59.
- Lousberg, L. and G. Jerusalem** (2017). "Safety and Efficacy and Patient Acceptability of Everolimus in the Treatment of Breast Cancer." Breast Cancer (Auckl) **10**: 239-252
- Lu, Z. P., Z. L. Ju, et al.** (2005). "Histone deacetylase inhibitor Trichostatin A reduces anti-DNA autoantibody production and represses IgH gene transcription." Biochem Biophys Res Commun **330**(1): 204-9.
- Lui, S. L., S. Yung, et al.** (2008). "Rapamycin prevents the development of nephritis in lupus-prone NZB/W F1 mice." Lupus **17**(4): 305-13.
- Ma, W., S. Mishra, et al.** (2007). "Cyclosporin A and FK506 inhibit IL-12p40 production through the calmodulin/calmodulin-dependent protein kinase-activated phosphoinositide 3-kinase in lipopolysaccharide-stimulated human monocytic cells." J Biol Chem **282**(18): 13351-62.
- Mackay, F. and C. Ambrose** (2003). "The TNF family members BAFF and APRIL: the growing complexity." Cytokine Growth Factor Rev **14**(3-4): 311-24.
- Mackay, F. and J. L. Browning** (2002). "BAFF: a fundamental survival factor for B cells." Nat Rev Immunol **2**(7): 465-75.
- Mackay, F. and H. Leung** (2006). "The role of the BAFF/APRIL system on T cell function." Semin Immunol **18**(5): 284-9.
- Mackay, F., S. A. Woodcock, et al.** (1999). "Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations." J Exp Med **190**(11): 1697-710.
- Majumdar, S. and B. B. Aggarwal** (2001). "Methotrexate suppresses NF-kappaB activation through inhibition of IkkappaBalpha phosphorylation and degradation." J Immunol **167**(5): 2911-20.
- Manetta, J., H. Bina, et al.** (2014) "Generation and characterization of tabalumab, a human monoclonal antibody that neutralizes both soluble and membrane-bound B-cell activating factor." J Inflamm Res **7**: 121-31.
- Manzi, S., J. Sanchez-Guerrero, et al.** (2012) "Effects of belimumab, a B lymphocyte stimulator-specific inhibitor, on disease activity across multiple organ domains in patients with systemic lupus erythematosus: combined results from two phase III trials." Ann Rheum Dis **71**(11): 1833-8.
- Mariette, X., S. Roux, et al.** (2003). "The level of BLyS (BAFF) correlates with the titre

- of autoantibodies in human Sjogren's syndrome." *Ann Rheum Dis* **62**(2): 168-71.
- McGuire**, J. J. (2003). "Anticancer antifolates: current status and future directions." *Curr Pharm Des* **9**(31): 2593-613.
- Mehrabi**, A., H. Fonouni, et al. (2006). "The role and value of sirolimus administration in kidney and liver transplantation." *Clin Transplant* **20 Suppl 17**: 30-43.
- Mishra**, N., C. M. Reilly, et al. (2003). "Histone deacetylase inhibitors modulate renal disease in the MRL-lpr/lpr mouse." *J Clin Invest* **111**(4): 539-52.
- Moisini**, I. and A. Davidson (2009). "BAFF: a local and systemic target in autoimmune diseases." *Clin Exp Immunol* **158**(2): 155-63.
- Molica**, S., G. Digiesi, et al. (2010) "Baff serum level predicts time to first treatment in early chronic lymphocytic leukemia." *Eur J Haematol* **85**(4): 314-20.
- Moore**, P. A., O. Belvedere, et al. (1999). "BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator." *Science* **285**(5425): 260-3.
- Moura**, R. A., H. Canhao, et al. (2013) "BAFF and TACI gene expression are increased in patients with untreated very early rheumatoid arthritis." *J Rheumatol* **40**(8): 1293-302.
- Mukhopadhyay**, A., J. Ni, et al. (1999). "Identification and characterization of a novel cytokine, THANK, a TNF homologue that activates apoptosis, nuclear factor-kappaB, and c-Jun NH2-terminal kinase." *J Biol Chem* **274**(23): 15978-81.
- Muller-Krebs**, S., L. Weber, et al. (2013) "Cellular effects of everolimus and sirolimus on podocytes." *PLoS One* **8**(11): e80340.
- Nardelli**, B., O. Belvedere, et al. (2001). "Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells." *Blood* **97**(1): 198-204.
- Natsumeda**, Y. and S. F. Carr (1993). "Human type I and II IMP dehydrogenases as drug targets." *Ann N Y Acad Sci* **696**: 88-93.
- Ng**, L. G., A. P. Sutherland, et al. (2004). "B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells." *J Immunol* **173**(2): 807-17.
- Nishikawa**, A., K. Suzuki, et al. (2016) "Identification of definitive serum biomarkers associated with disease activity in primary Sjogren's syndrome." *Arthritis Res Ther* **18**(1): 106.
- Novak**, A. J., J. R. Darce, et al. (2004). "Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival." *Blood* **103**(2): 689-94.
- Novak**, A. J., D. M. Grote, et al. (2004). "Expression of BLyS and its receptors in B-cell non-Hodgkin lymphoma: correlation with disease activity and patient outcome." *Blood* **104**(8): 2247-53.
- O'Connor**, B. P., V. S. Raman, et al. (2004). "BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells." *J Exp Med* **199**(1): 91-8.
- Ogbomo**, H., M. Michaelis, et al. (2007). "Histone deacetylase inhibitors suppress natural killer cell cytolytic activity." *FEBS Lett* **581**(7): 1317-22.
- Ohata**, J., N. J. Zvaifler, et al. (2005). "Fibroblast-like synoviocytes of mesenchymal origin express functional B cell-activating factor of the TNF family in response to proinflammatory cytokines." *J Immunol* **174**(2): 864-70.
- Oki**, Y., G. V. Georgakis, et al. (2007). "Elevated serum BLyS levels in patients with non-Hodgkin lymphoma." *Leuk Lymphoma* **48**(9): 1869-71.
- Oldstone**, M. B. (1998). "Molecular mimicry and immune-mediated diseases." *FASEB J* **12**(13): 1255-65.
- Olejarz**, W., D. Bryk, et al. (2014) "Mycophenolic acid attenuates the tumour necrosis factor-alpha-mediated proinflammatory response in endothelial cells by blocking the MAPK/NF-kappaB and ROS pathways." *Eur J Clin Invest* **44**(1): 54-64.
- Parsons**, R. F., K. Vivek, et al. (2010) "B-lymphocyte homeostasis and BLyS-directed immunotherapy in transplantation." *Transplant Rev (Orlando)* **24**(4): 207-21.
- Patel**, R. and P. I. Terasaki (1969). "Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation." *N Engl J Med* **280**(14): 735-9.
- Pego-Reigosa**, J. M., T. Cobo-Ibanez, et al. (2013) "Efficacy and safety of nonbiologic

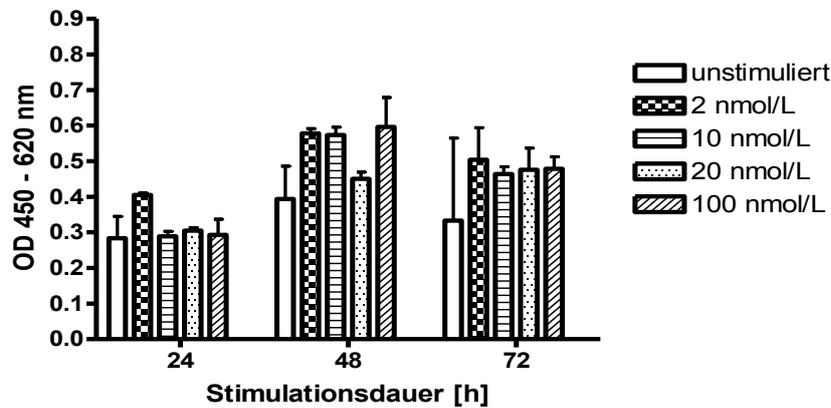
- immunosuppressants in the treatment of nonrenal systemic lupus erythematosus: a systematic review." Arthritis Care Res (Hoboken) **65**(11): 1775-85.
- Petri, M., W. Stohl, et al.** (2008). "Association of plasma B lymphocyte stimulator levels and disease activity in systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **58**(8): 2453-9.
- Phatak, S., S. Chaurasia et al.** (2017) "Urinary B cell activating factor (BAFF) and a proliferation-inducing ligand (APRIL): potential biomarkers of active lupus nephritis" Clin Exp Immunol **187**(3):376-382
- Posalski, J. D., M. Ishimori, et al.** (2009). "Does mycophenolate mofetil prevent extra-renal flares in systemic lupus erythematosus? Results from an observational study of patients in a single practice treated for up to 5 years." Lupus **18**(6): 516-21.
- Puttarajappa, C., R. Shapiro, et al.** (2012) "Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: a review." J Transplant: 193724.
- Qu, H., W. Bian, et al.** (2014) "A novel NF-kappaB inhibitor, DHMEQ, ameliorates pristane-induced lupus in mice." Exp Ther Med **8**(1): 100-104.
- Quartuccio S., S. Salvin et al** (2016). "Efficacy of Belimumab and targeting rheumatoid factor positive B-cell expansion in Sjögren's syndrome: Follow-up after the end of the phase II open label BELISS study." Clin Exp Rheumatol. **34**(2):311-4
- Reveille, J. D.** (2006). "Major histocompatibility genes and ankylosing spondylitis." Best Pract Res Clin Rheumatol **20**(3): 601-9.
- Reyes, L. I., F. Leon, et al.** (2008). "Dexamethasone inhibits BAFF expression in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis." Cytokine **42**(2): 170-8.
- Rodriguez, B., H. Valdez, et al.** (2003). "Plasma levels of B-lymphocyte stimulator increase with HIV disease progression." AIDS **17**(13): 1983-5.
- Rolink, A. G., E. ten Boekel, et al.** (1999). "B cell development in the mouse from early progenitors to mature B cells." Immunol Lett **68**(1): 89-93.
- Rose, N. R. and C. Bona** (1993). "Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited)." Immunol Today **14**(9): 426-30.
- Salzer, U., S. Jennings, et al.** (2007). "To switch or not to switch--the opposing roles of TACI in terminal B cell differentiation." Eur J Immunol **37**(1): 17-20.
- Sarantopoulos, S., K. E. Stevenson, et al.** (2007). "High levels of B-cell activating factor in patients with active chronic graft-versus-host disease." Clin Cancer Res **13**(20): 6107-14.
- Sarantopoulos, S., K. E. Stevenson, et al.** (2009). "Altered B-cell homeostasis and excess BAFF in human chronic graft-versus-host disease." Blood **113**(16): 3865-74.
- Sango C., D. Merino et al** (2016) "B-Cell-Activating Faktor Levels Are Associated With Antibody-Mediated Histological Damage in Kidney Transplantation." Transplant Proc **48**(9) 2910-2912
- Scapini, P., B. Nardelli, et al.** (2003). "G-CSF-stimulated neutrophils are a prominent source of functional BlyS." J Exp Med **197**(3): 297-302.
- Schaumann, D. H., J. Tuischer, et al.** (2007). "VCAM-1-positive stromal cells from human bone marrow producing cytokines for B lineage progenitors and for plasma cells: SDF-1, flt3L, and BAFF." Mol Immunol **44**(7): 1606-12.
- Schmidt, A., L. Hennighausen, et al.** (1990). "Inducible nuclear factor binding to the kappa B elements of the human immunodeficiency virus enhancer in T cells can be blocked by cyclosporin A in a signal-dependent manner." J Virol **64**(8): 4037-41.
- Schneider, P., F. MacKay, et al.** (1999). "BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth." J Exp Med **189**(11): 1747-56.
- Schneider, P. and J. Tschopp** (2003). "BAFF and the regulation of B cell survival." Immunol Lett **88**(1): 57-62.
- Scholzen, A., A. C. Teirlinck, et al.** (2014) "BAFF and BAFF receptor levels correlate with B cell subset activation and redistribution in controlled human malaria infection." J Immunol **192**(8): 3719-29.
- Segal, R., M. Dayan, et al.** (1995). "Methotrexate treatment in murine experimental systemic lupus erythematosus (SLE); clinical benefits associated with cytokine

- manipulation." Clin Exp Immunol **101**(1): 66-72.
- Sehgal**, S. N. (1998). "Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression." Clin Biochem **31**(5): 335-40.
- Setiadi**, A. F., K. Omilusik, et al. (2008). "Epigenetic enhancement of antigen processing and presentation promotes immune recognition of tumors." Cancer Res **68**(23): 9601-7.
- Shu**, H. B., W. H. Hu, et al. (1999). "TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens." J Leukoc Biol **65**(5): 680-3.
- Sijkens**, Y. W., Doxiadis, II, et al. (1999). "Sharing cross-reactive groups of MHC class I improves long-term graft survival." Kidney Int **56**(5): 1920-7.
- Smith**, C. A., T. Farrah, et al. (1994). "The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death." Cell **76**(6): 959-62.
- Smith**, C. K. and M. J. Kaplan (2015) "The role of neutrophils in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus." Curr Opin Rheumatol **27**(5): 448-53.
- Sollinger**, H. W. (1995). "Mycophenolate mofetil." Kidney Int Suppl **52**: S14-7.
- Specks**, U. (2005). "Methotrexate for Wegener's granulomatosis: what is the evidence?" Arthritis Rheum **52**(8): 2237-42.
- Spurlock**, C. F., 3rd, H. M. t. Gass, et al. (2015) "Methotrexate-mediated inhibition of nuclear factor kappaB activation by distinct pathways in T cells and fibroblast-like synoviocytes." Rheumatology (Oxford) **54**(1): 178-87.
- Stohl**, W., G. S. Cheema, et al. (2002). "B lymphocyte stimulator protein-associated increase in circulating autoantibody levels may require CD4+ T cells: lessons from HIV-infected patients." Clin Immunol **104**(2): 115-22.
- Stohl**, W., J. T. Merrill, et al. (2013) "Efficacy and safety of belimumab in patients with rheumatoid arthritis: a phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging Study." J Rheumatol **40**(5): 579-89.
- Stohl**, W., S. Metyas, et al. (2003). "B lymphocyte stimulator overexpression in patients with systemic lupus erythematosus: longitudinal observations." Arthritis Rheum **48**(12): 3475-86.
- Strober**, B. E. and K. Menon (2005). "Folate supplementation during methotrexate therapy for patients with psoriasis." J Am Acad Dermatol **53**(4): 652-9.
- Sundstrom**, C. and K. Nilsson (1976). "Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937)." Int J Cancer **17**(5): 565-77.
- Surjushe**, A. and D. G. Saple (2008). "Mycophenolate mofetil." Indian J Dermatol Venereol Leprol **74**(2): 180-4.
- Sutherland**, A. P., F. Mackay, et al. (2006). "Targeting BAFF: immunomodulation for autoimmune diseases and lymphomas." Pharmacol Ther **112**(3): 774-86.
- Tangye**, S. G., V. L. Bryant, et al. (2006). "BAFF, APRIL and human B cell disorders." Semin Immunol **18**(5): 305-17.
- Thibault-Espitia**, A., Y. Foucher, et al. (2012) "BAFF and BAFF-R levels are associated with risk of long-term kidney graft dysfunction and development of donor-specific antibodies." Am J Transplant **12**(10): 2754-62.
- Thim**, T., M. Maeng, et al. (2012) "Zotarolimus-eluting vs. sirolimus-eluting coronary stents in patients with and without acute coronary syndromes: a SORT OUT III substudy." Eur J Clin Invest.
- Thomas**, M. D., B. Srivastava, et al. (2006). "Regulation of peripheral B cell maturation." Cell Immunol **239**(2): 92-102.
- Thompson**, J. S., P. Schneider, et al. (2000). "BAFF binds to the tumor necrosis factor receptor-like molecule B cell maturation antigen and is important for maintaining the peripheral B cell population." J Exp Med **192**(1): 129-35.
- Toubi**, E., S. Gordon, et al. (2006). "Elevated serum B-Lymphocyte activating factor (BAFF) in chronic hepatitis C virus infection: association with autoimmunity." J Autoimmun **27**(2): 134-9.
- Vadacca**, M., D. Margiotta, et al. (2010) [BAFF/APRIL pathway in Sjogren syndrome

- and systemic lupus erythematosus: relationship with chronic inflammation and disease activity]." Reumatismo **62**(4): 259-65.
- Vafadari**, R., R. Kraaijeveld, et al. (2010) "Tacrolimus inhibits NF-kappaB activation in peripheral human T cells." PLoS One **8**(4): e60784.
- Valdes**, J. A., E. Gaggero, et al. (2008). "NFAT activation by membrane potential follows a calcium pathway distinct from other activity-related transcription factors in skeletal muscle cells." Am J Physiol Cell Physiol **294**(3): C715-25.
- van Besouw**, N. M., B. J. van der Mast, et al. (1999). "Effect of mycophenolate mofetil on erythropoiesis in stable renal transplant patients is correlated with mycophenolic acid trough levels." Nephrol Dial Transplant **14**(11): 2710-3.
- Vannucchi**, G., D. Covelli, et al. (2012) "Serum BAFF concentrations in patients with Graves' disease and orbitopathy before and after immunosuppressive therapy." J Clin Endocrinol Metab **97**(5): E755-9.
- Vignot**, S., S. Faivre, et al. (2005). "mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives." Ann Oncol **16**(4): 525-37.
- Villarroel**, M. C., M. Hidalgo, et al. (2009). "Mycophenolate mofetil: An update." Drugs Today (Barc) **45**(7): 521-32.
- Vincent**, F. B., E. F. Morand, et al. (2014) "The BAFF/APRIL system in SLE pathogenesis." Nat Rev Rheumatol **10**(6): 365-73.
- Walsh**, M., M. James, et al. (2007). "Mycophenolate mofetil for induction therapy of lupus nephritis: a systematic review and meta-analysis." Clin J Am Soc Nephrol **2**(5): 968-75.
- Warner**, L. M., L. M. Adams, et al. (1994). "Rapamycin prolongs survival and arrests pathophysiologic changes in murine systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **37**(2): 289-97.
- Watanabe**, T. (2010) "Investigational histone deacetylase inhibitors for non-Hodgkin lymphomas." Expert Opin Investig Drugs **19**(9): 1113-27.
- Wei**, L. Q., Y. G. Liang, et al. (2016) "Efficacy and Safety of Belimumab Plus Standard Therapy in Patients With Systemic Lupus Erythematosus: A Meta-analysis." Clin Ther **38**(5): 1134-40.
- Weimer**, R., J. Mytilineos, et al. (2003). "Mycophenolate mofetil-based immunosuppression and cytokine genotypes: effects on monokine secretion and antigen presentation in long-term renal transplant recipients." Transplantation **75**(12): 2090-9.
- Wekerle**, H., M. Bradl, et al. (1996). "The shaping of the brain-specific T lymphocyte repertoire in the thymus." Immunol Rev **149**: 231-43.
- Whitton**, J. L. and R. S. Fujinami (1999). "Viruses as triggers of autoimmunity: facts and fantasies." Curr Opin Microbiol **2**(4): 392-7.
- Wiesner**, R., J. Rabkin, et al. (2001). "A randomized double-blind comparative study of mycophenolate mofetil and azathioprine in combination with cyclosporine and corticosteroids in primary liver transplant recipients." Liver Transpl **7**(5): 442-50.
- Xu**, H., X. He, et al. (2009). "Abnormal high expression of B-cell activating factor belonging to the TNF superfamily (BAFF) associated with long-term outcome in kidney transplant recipients." Transplant Proc **41**(5): 1552-6.
- Xu**, S. and K. P. Lam (2001). "B-cell maturation protein, which binds the tumor necrosis factor family members BAFF and APRIL, is dispensable for humoral immune responses." Mol Cell Biol **21**(12): 4067-74.
- Yan**, M., J. R. Brady, et al. (2001). "Identification of a novel receptor for B lymphocyte stimulator that is mutated in a mouse strain with severe B cell deficiency." Curr Biol **11**(19): 1547-52.
- Yan**, M., S. A. Marsters, et al. (2000). "Identification of a receptor for BlyS demonstrates a crucial role in humoral immunity." Nat Immunol **1**(1): 37-41.
- Yang**, M., M. Li, et al. (2014) "Calcineurin inhibitors may be a reasonable alternative to cyclophosphamide in the induction treatment of active lupus nephritis: A systematic review and meta-analysis." Exp Ther Med **7**(6): 1663-1670.

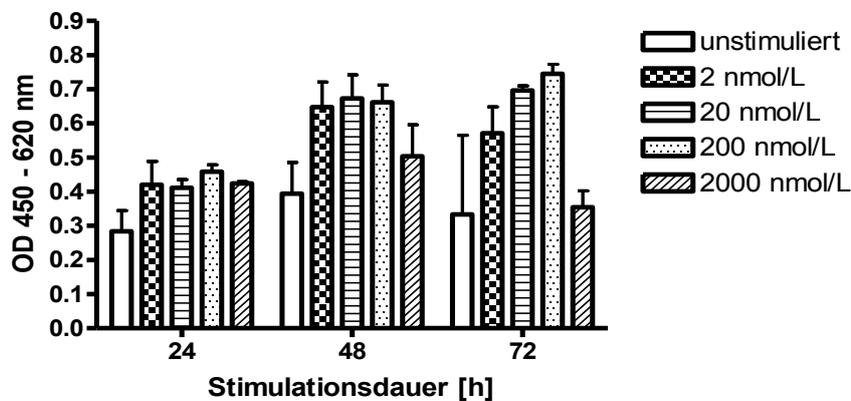
- Ye, Q., L. Wang, et al.** (2004). "BAFF binding to T cell-expressed BAFF-R costimulates T cell proliferation and alloresponses." Eur J Immunol **34**(10): 2750-9.
- Yu, G., T. Boone, et al.** (2000). "APRIL and TALL-1 and receptors BCMA and TACI: system for regulating humoral immunity." Nat Immunol **1**(3): 252-6.
- Zeng, Q., H. Zhang, et al.** (2015) "Rapamycin inhibits BAFF-stimulated cell proliferation and survival by suppressing mTOR-mediated PP2A-Erk1/2 signaling pathway in normal and neoplastic B-lymphoid cells." Cell Mol Life Sci **72**(24): 4867-84.
- Zhang, J., V. Roschke, et al.** (2001). "Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus." J Immunol **166**(1): 6-10.
- Zhang, P., Liu X. et al** (2016) "B Cell-Activating Fctor as a New Potential Marker in Inflammatory Bowel Disease." Dig Dis Sci **61**: 2608-2618
- Zheng, X. F., D. Florentino, et al.** (1995). "TOR kinase domains are required for two distinct functions, only one of which is inhibited by rapamycin." Cell **82**(1): 121-30.
- Zhu, B., N. Chen, et al.** (2007). "Mycophenolate mofetil in induction and maintenance therapy of severe lupus nephritis: a meta-analysis of randomized controlled trials." Nephrol Dial Transplant **22**(7): 1933-42.
- Zhu, X. J., Y. Shi, et al.** (2009). "High-dose dexamethasone inhibits BAFF expression in patients with immune thrombocytopenia." J Clin Immunol **29**(5): 603-10.
- Zhukovsky, E. A., J. O. Lee, et al.** (2004). "TNF ligands: is TALL-1 a trimer or a virus-like cluster?" Nature **427**(6973): 413-4; discussion 414.
- Zollars, E., J. Bienkowska, et al.** (2015) "BAFF (B cell activating factor) transcript level in peripheral blood of patients with SLE is associated with same-day disease activity as well as global activity over the next year." Lupus Sci Med **2**(1): e000063.

## 10. Anhang



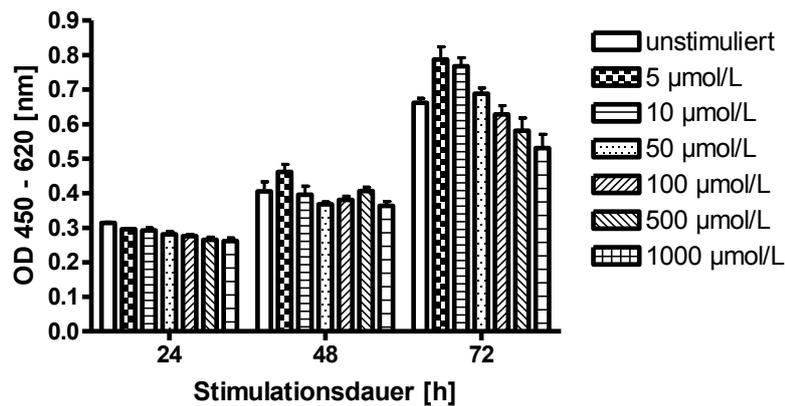
**Abb. 23: Rapamycin zeigt keinen Einfluss auf die Viabilität von Monozyten.**

U937-Zellen wurden mit 2, 10, 20 und 100 nmol/L Rapamycin stimuliert. Nach einer Stimulationsdauer von 24, 48 und 72 h erfolgte die Viabilitätsbestimmung mittels WST-Assay. Eine Abnahme der Zellviabilität durch die verwendeten Konzentrationen konnte verglichen mit unstimulierten Zellen (leer) nicht nachgewiesen werden. Die dünnen Balken stellen die Standardabweichung (SD) dar.



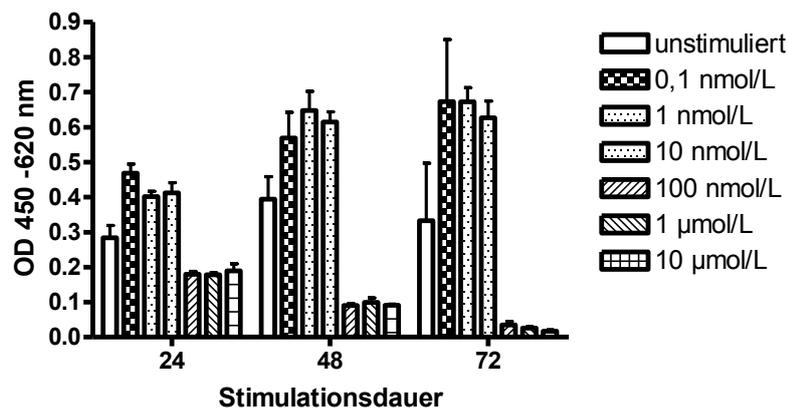
**Abb. 24: Cyclosporin A führt zu keiner Abnahme der Zellviabilität in Monozyten.**

U937-Zellen wurden mit 2, 20, 200 und 2000 nmol/L Cyclosporin A stimuliert. Nach einer Stimulationsdauer von 24, 48, und 72 h wurde die Viabilität der Zellen mittels WST-Assay ermittelt. Es war keine Reduktion der Zellviabilität verglichen mit unstimulierten Zellen (leer) nachweisbar. Die Standardabweichung (SD) wird durch die kleinen Balken angegeben.



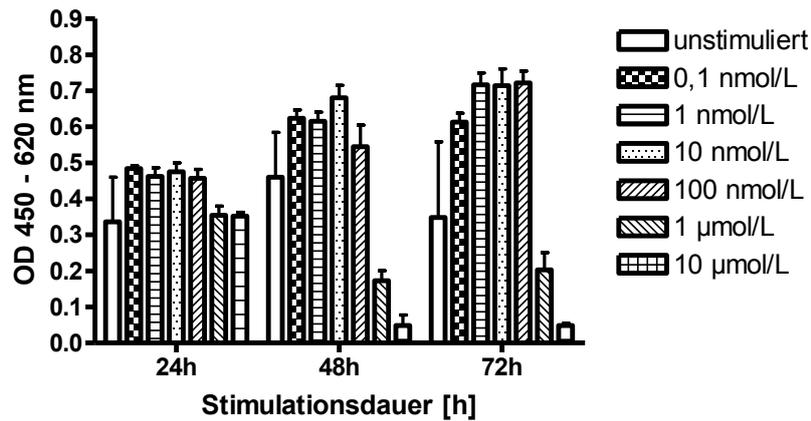
**Abb. 25: Valproinsäure wirkt nicht zytotoxisch auf Monozyten.**

U937-Zellen wurden mit 5, 10, 50, 100, 500 und 1000 µmol/L Valproinsäure stimuliert und für 24, 48, und 72 h inkubiert. Die Zahl metabolisch aktiver Zellen wurde mit Hilfe eines WST-Assays bestimmt. Im Vergleich zu unstimulierten Zellen (weiß) zeigte sich keine signifikante Reduzierung der Zellviabilität. Die kleinen Balken stellen die Standardabweichung (SD) dar.



**Abb. 26: Nach Stimulation mit Methotrexat ist eine Reduzierung der metabolisch aktiven Zellen nachweisbar.**

U937-Zellen wurden mit sechs Konzentrationen Methotrexat ( 0,1, 1, 10, 100 nmol/L sowie, 1 und 10 µmol/L ) stimuliert. Nach der 24-, 48-, und 72stündigen Inkubationszeit wurde mittels WST-Assay die Zellviabilität bestimmt. Nach 48 und 72 h konnte eine Reduktion der Viabilität durch 100 nmol/l, 1 µmol/L und 10 µmol/L verglichen mit unstimulierten Zellen (leer) nachgewiesen werden. Die kleinen Balken stellen die Standardabweichung (SD) dar.



**Abb. 27: Mycophenolatmofetil führt zu einer Reduktion der Zellviabilität in Monozyten.**

Es erfolgte die Stimulation von U937-Zellen mit 0,1, 1, 10 100 nmol/L sowie 1 und 10 µmol/L Mycophenolatmofetil und die anschließende Inkubation für 24, 48 und 72 h. Nach der Zellernte wurde mit Hilfe eines WST-Assays die Zellviabilität ermittelt. Verglichen mit unstimulierten Zellen (leer) war eine Reduktion der Zellviabilität durch 1 und 10 µmol/L nach 48 und 72 h Inkubation detektierbar. Die kleinen Balken stellen die Standardabweichung (SD) dar.

## 11. Ehrenwörtliche Erklärung

### Erklärung zur Dissertation:

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck der Promotion oder eines anderen ähnlichen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## 12. Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern Angela Köhler-Jank und Dr. Stephan Jank für ihren uneingeschränkten Rückhalt und die immerwährende liebevolle Unterstützung auf meinem gesamten Lebensweg.

Herrn Prof. Dr. med Kaps danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an der Neurologischen Klinik der Justus-Liebig-Universität durchführen zu können. Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Blaes für die interessante Themenstellung und die Betreuung meiner Doktorarbeit.

Mein besonderer Dank gilt Sandra Bick für die exzellente und geduldige Einarbeitung in die Laborarbeit und jederzeit gewährte engagierte Hilfe bei experimentellen Problemen. Vielen Dank auch für die konstruktive Kritik und die Diskussionsbereitschaft. Darüber hinaus danke ich ihr für die stets positiv menschliche und freundschaftliche Zusammenarbeit. Desweiteren danke ich allen Mitarbeitern des neurochemischen Labors, insbesondere Edith und Prathiba für die gute Arbeitsatmosphäre und die vielen netten Gespräche.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Brüdern, meinem Freund und meinen Freunden bedanken, die für die moralische und motivierende Unterstützung sorgten.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the  
electronic version of the paper.**