

De Differentiatie en Regulatie van Bregs in Auto-immuunziekten

Scriptie in de Pathofysiologie

Door :Mathilde Vermeer

Studentnummer: 1812637

Begeleider: Prof. Dr. P. Heeringa

Inhoudsopgave

<u>Voorblad</u>	<u>1</u>
<u>Inhoudsopgave</u>	<u>2</u>
<u>Samenvatting</u>	<u>3</u>
<u>Inleiding</u>	<u>3</u>
<u>Modellen/Theorieën</u>	<u>4</u>
• <u>Ontdekking van de Breg</u>	<u>4</u>
• <u>Oorsprong van de Breg</u>	<u>5</u>
• <u>Moleculen betrokken bij de differentiatie van Bregs</u>	<u>7</u>
• <u>Samenhang tussen Bregs en Tregs</u>	<u>8</u>
• <u>Onderzoeksvoorbeelden</u>	<u>9</u>
<u>Discussie & Speculatie</u>	<u>12</u>
<u>Conclusie</u>	<u>13</u>
<u>Literatuurlijst</u>	<u>14</u>

Samenvatting

Onderzoek heeft aangetoond dat bepaalde IL-10 producerende B-cellen, zogenoemde regulatoire B-cellen (Bregs), immuunonderdrukkende functies kunnen uitoefenen. IL-10, een pleiotroop cytokine, kan ontstekingen onderdrukken door de productie van immuunstimulerende cytokines te remmen en de expressie van MHC-II te verhogen. Bij de differentiatie van regulatoire B-cellen zijn onder andere Toll-Like receptoren, CD40 en B-cel receptoren betrokken. Deze Bregs kunnen verscheidene cellen zoals Tregs, dendritische cellen, macrofagen en CD4+ en CD8+ T-cellen aansturen om immuunresponsen in het lichaam te onderdrukken. Er is nog weinig informatie bekend over de precieze oorsprong van Bregs. In vergelijking met andere typen B-cellen vertonen regulatoire B-cellen een hogere plasticiteit. Tevens is onderzoek er nog niet in geslaagd fenotypische markers, gekoppeld aan transcriptiefactoren, te identificeren wat de functionele karakterisatie van deze cellen bemoeilijkt. Het gebrek aan deze kennis maakt het tevens lastiger te achterhalen of er één of meerdere subtypen Bregs bestaan. Autoreactieve B- en T-lymfocyten zijn de primaire mediators van auto-immuunziekten waarbij het lichaam reageert op "eigen" antigenen. Als gevolg hiervan ontstaan er ontstekingen, weefselschade en in bepaalde gevallen ook orgaanschade. Patiënten met auto-immuunziekten kunnen baat hebben bij de onderdrukkende werking van Bregs. In deze scriptie wordt de achtergrond, het differentiatieproces en de tegenstrijdigheden rondom regulatoire B-cellen beschreven aan de hand van onderzoek aan verschillende auto-immuunziekten zoals Multiple sclerose, Reumatoïde artritis en Systemische lupus erythematoses.

Inleiding

Antistof producerende B-cellen behoren tot de humorale respons op antigenen in het lichaam. B-cellen worden over het algemeen geassocieerd als mediators betrokken bij de activatie van immunologische reacties. De laatste twintig jaar zijn er echter aspecten van B-cellen ontdekt die een andere kant van B-cellen benadrukken. Zo zouden ze bijvoorbeeld antigeen kunnen presenteren, een grote verscheidenheid aan cytokines kunnen produceren en kunnen IL-10 producerende B-cellen een immuunonderdrukkende werking uitoefenen (Mauri & Bosma 2012). Tegenwoordig wordt er veel onderzoek gedaan naar de onderdrukkende werking van IL-10 producerende B-cellen, welke ook wel regulatoire B-cellen of Bregs worden genoemd. Essentieel voor de werking van Bregs is interleukine-10, een immuunregulerende cytokine met pleiotrope functies. IL-10 kan ontstekingsreactie onderdrukken door middel van verschillende mechanismen. Dit zijn met name het verlagen van de productie van immuunstimulerende cytokines, zoals IFN- γ en IL-17, en het tot expressie brengen van MHC-II moleculen (Carter et al. 2011). Al eerder werd aangetoond dat er regulatoire varianten bestaan van T-cellen in het lichaam. Deze zogenoemde Treg kan verscheidene immuunreacties moduleren, bijvoorbeeld bij auto-immuniteit. Tregs brengen vaak hoge niveaus van CD25 tot expressie en hun ontwikkeling en functie is afhankelijk van de transcriptiefactor Foxp3 (Ray et al. 2012). Verscheidene studies hebben aangetoond dat Bregs immuunreacties kunnen onderdrukken in verschillende auto-immuunziekten. Auto-immuunziekten zijn aandoeningen waarbij het lichaam immunologisch reageert op eigen antigenen. Normaal gesproken herkent het lichaam antigenen als lichaamseigen en vindt er geen immunologische reactie plaats. Bij auto-immuunziekten valt het lichaam dus haar eigen cellen en weefsels aan, waardoor er ontstekingen en weefselschade ontstaan.

Multiple Sclerose (MS) is een auto-immuunziekte, welke primair gemedieerd wordt door T-cellen die ontstekingsstimulerende cytokines produceren zoals IFN- γ , TNF α en IL-17 als reactie op autoantigenen in het centrale zenuwstelsel (Luc Van Kear 2011). MS is goed na te bootsen in een diermodel. Dit heet het Experimentaal Auto-immune Encephalomyelitis (EAE) model wat een experimenteel systeem is waarbij een dier wordt geïmmuniseerd met een eiwit afkomstig uit de

hersenen plus een sterk adjuvant. Dit dier verwerft een auto-immuunziekte gemedieerd door Th1-type, Th17-type en vertraagde overgevoelighedsreacties (DTH) wat enigszins lijkt op MS in mensen (Matzinger & Kamala 2011). MS en EAE zijn aan elkaar vergelijkbaar in ziektegevoeligheid, verloop en histopathologisch onderzoek (Matsushita et al. 2008). Tevens spelen B-cellen geen rol bij de inductie van de ziekte, maar zijn wel betrokken zijn bij de immunomodulatie van de aandoening (Lemoine et al. 2009).

Autoantilichaam positieve Systemische lupus erythematoses (SLE) is een auto-immuunziekte waarbij in vrijwel elk deel van het lichaam ontstekingen kunnen ontstaan. De ziekte wordt gekarakteriseerd door de aanwezigheid van autoreactieve B-lymfocyten. Autoantilichamen, geproduceerd door deze autoreactieve B-lymfocyten, reageren onder andere tegen dsDNA, het RNA-molecuul/eiwitcomplex Sm en ribonucleoproteïnes (Burness & McCormack 2011). De toegepaste therapie, met name B-celdepletie therapie, bestaat uit verscheidene stoffen die B-cel homeostase en overleving remmen.

Reumatoïde artritis (RA) is een chronische immuungemedieerde ziekte waarbij ontstekingen ontstaan aan het synovium in gewrichten, wat leidt tot progressieve afbraak van het kraakbeen en de gewrichten. De ziekte wordt gekarakteriseerd door hevige ontstekingen in het lichaam die zowel door het cellulair als het humorale immuunsysteem worden gemedieerd (Nakken et al. 2011).

Deze auto-immuunziekten onderscheiden zich op immunologisch vlak sterk van elkaar. Het blijkt dat bij SLE Bregs de onderdrukkende functie hebben verloren, terwijl bij MS de onderdrukkende functie wel behouden blijft. Onderzoeksvoorbeelden aan beide ziekten benadrukken op deze manier meerdere aspecten en geven zo een completer beeld van Breg-functie.

Ondanks dat studies de immuunonderdrukkende functie van Bregs bij auto-immuunziekten aantonen, zijn de resultaten niet eenduidig en blijft de karakterisatie van Bregs moeilijk. Ten eerste heeft IL-10, essentieel voor de onderdrukkende functie van Bregs, ook een stimulerende werking op de groei en ontwikkeling van (auto-)antilichamen producerende plasmacellen. Ten tweede is activatie via CD40 een vereiste, maar tevens weer een belangrijke component in b-cel ontwikkeling en antilichaamproductie (Mauri & Bosma 2012). Naast CD40 wordt tevens de betrokkenheid van de TLR en de BCR later toegelicht.

Nu is de regulatoire B-cel net als geheugen B-cel een bepaald type B-cel. Een aannemelijke mogelijkheid is dat regulatoire B-cellen zelf ook weer onderverdeeld kunnen worden in subtypes. In principe is elk type B-cel onderhevig aan omgevingsfactoren. Bij elk ander type B-cel is het onderzoek er echter in geslaagd fenotypische merkers, gekoppeld aan transcriptiefactoren, te identificeren. In vergelijking met de Breg vertonen deze andere typen B-cellen minder plasticiteit en zijn ze functies beter gekarakteriseerd. Vanwege de hoge plasticiteit van Bregs zijn de onderzoeksresultaten erg tegenstrijdig en hierdoor zijn ze in hoge mate situatieafhankelijk.

De bovenstaande tegenstrijdigheden doen de vraag oprijzen of er sprake is van een alomvattende immuunonderdrukkende werking van Bregs in auto-immuunziekten. Of valt het te wijten aan geassocieerde moleculen betrokken bij Breg-differentiatie? Om deze vraag te beantwoorden zal de ontdekking en enkele oorsprongstheorieën rondom regulatoire B-cellen worden uiteengezet. Ook zal de mate waarin geassocieerde moleculen betrokken zijn bij de differentiatie worden besproken. Als laatste wordt onderzoek naar de auto-immuunziekten MS, RA en SLE aangehaald om een goed beeld te schetsen van de werking van regulatoire B-cellen.

Modellen & Theorieën

Ontdekking van de Breg

Bij de activatie van immuuncellen zijn omgevingsfactoren van groot belang. Bij lymfocyten kun je hierbij denken aan antigeen-presenterende cellen, receptoren, CD markers, cytokines etc. Nu bestaan er verschillende subtypen B-cellen welke ontstaan zijn vanuit een andere oorsprong of welke door omgevingsfactoren zijn veranderd in een ander type, zoals plasmacellen en geheugencellen. In

de afgelopen decennia heeft men ontdekt dat IL-10 producerende B-cellen een immuunonderdrukkende werking kunnen hebben. IL-10 is een pleiotroop cytokine dat zowel ontstekingsstimulerend als onderdrukkend kan werken en hiermee was de basis gelegd voor een nieuw type B-cel. Eén van de eerste onderzoeken werd begin jaren 70 uitgevoerd. Al snel daarna werd ontdekt dat muizen met een B-celdeficiëntie niet in staat waren van EAE te herstellen. Hier kwam de aanname uit voort dat naast de negatieve effecten, B-cellen ook een gunstig effect op auto-immuunziekten konden uitoefenen (Mauri & Bosma 2012). Verschillende onderzoeksopzetten leidden tot de ontdekking dat alleen IL-10 producerende B-cellen deze gunstige eigenschappen bezaten. Het bleek dat de Breg-productie piekte op het hoogtepunt van ontsteking wat de progressie van de Th2-gedreven ziekte onderdrukte. De Th2-respons zet met name B-cellen aan tot proliferatie en de productie van antilichamen. De respons wordt gepromoot door de productie van IL-4 en IL-10 en is tevens autoregulatorisch. Wanneer dit proces in gang is gezet houdt het zichzelf tevens in stand. In dit voorbeeld wordt al aangetoond dat de bron van IL-10 productie een rol speelt in de switch tussen de ontstekingsstimulerende of ontstekingsonderdrukkende werking.

Pas vanaf 2007 kwamen de eerste doorbraken in onderzoek naar Bregs in mensen. Toen kwam men tot de ontdekking dat mensen met Multiple Sclerose een verslechterde IL-10 productie van B-cellen bleken te hebben. In datzelfde jaar werd ontdekt dat bij mensen met SLE, B-celdepletie therapie zorgde voor een functionele nieuwe Breg-productie (Mauri & Bosma 2012).

Sindsdien heeft men veel onderzoek gedaan naar deze immuunonderdrukkende functies van Bregs en de potentie die deze cellen kunnen uitdragen voor mensen met auto-immuunziekten. MS is hier een goed voorbeeld van, omdat MS makkelijk na te bootsen is bij dieren in de vorm van EAE. Tegenwoordig is er nog weinig bekend over de precieze oorsprong van deze Bregs en is ook aangetoond dat er waarschijnlijk meerdere subtypes van regulatorische B-cellen bestaan. Ook wordt er veel gespeculeerd over de precieze werking van Bregs. Ondanks het feit dat regulatorische B-cellen tegenwoordig nog geen unieke set van oppervlaktemarkers bezitten en ze geen gedefinieerde transcriptiefactor bezitten die hun werking en functie aanduidt, is men toch overtuigd van het bestaan van deze nieuw gedefinieerde type B-cel (Gray & Gray 2010). Het lijkt erop dat Bregs meer onderhevig zijn aan omgevingsfactoren dan andere typen B-cellen en onderzoek wijst uit dat Bregs bij lang niet elke auto-immuunziekte even effectief zijn in het onderdrukken van immunoreacties.

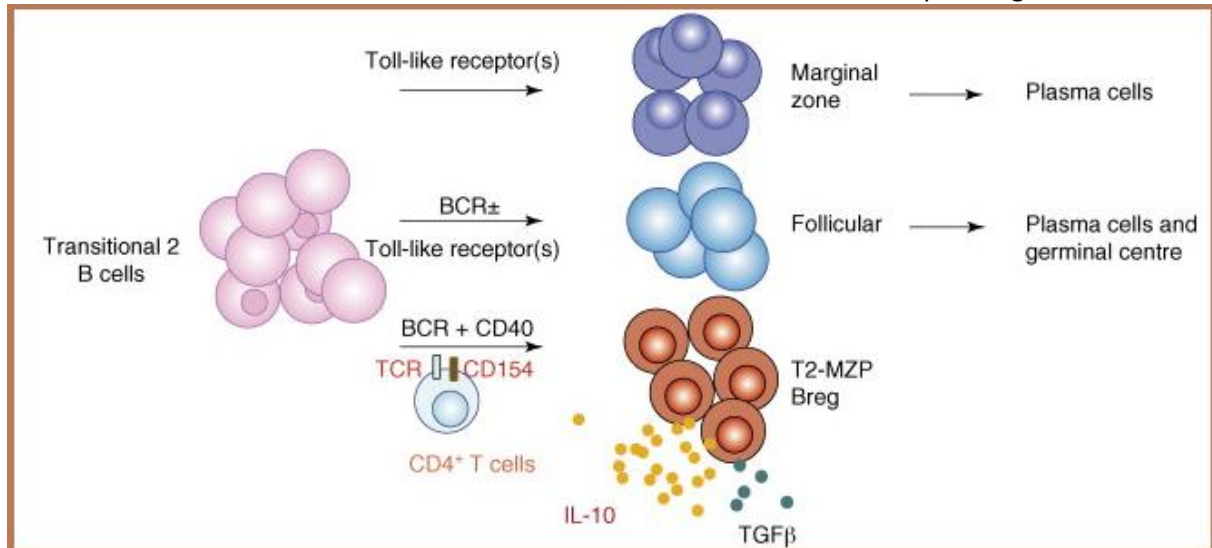
Oorsprong van de Breg

De grote diversiteit van regulatorische B-cellen heeft geleid tot vele controversen over de oorsprong van de Breg. Dit leidt tot verschillende modellen over welke voorloper B-cel nou verantwoordelijk is voor de populatie van Bregs.

Het model van Lampropoulou et al suggereert dat regulatorische B-cellen hun oorsprong hebben in de primaire en secundaire lymfoïde follikels in de secundaire en tertiaire lymfoïde organen, zoals de lymfeknopen en de milt (FO B cellen). Hoewel alle typen B-cellen IL-10 kunnen produceren na activatie door middel van de TLR, is het aannemelijk dat slechts één subtype B-cel in staat is om onder andere auto-immuunziekten te reguleren, de Breg. Deze FO B-cellen worden in een 2-stapsgewijze stimulatie gevormd tot regulatorische B-cellen. Allereerst vindt er een milde stimulatie plaats door de trigger van de TLR, wat resulteert in een minimale productie van IL-10 wat daarna wordt versterkt door de stimulatie van de BCR en CD40. Wat hen doet vermoeden dat de FO B cel de voorlopercel is van de Breg, is de observatie dat wanneer deze cellen het TLR-siginaalreceptor-MyD88 missen, deze cellen kiemcentra vormen en antigeenspecifieke antilichamen produceren (Lampropoulou et al. 2008). Merkwaardig is wel dat FO B-cellen van alle typen B-cellen de cel is welke het minste IL-10 produceert. Dit terwijl de Breg nou juist haar onderdrukkende werking te danken heeft aan de productie van IL-10 (Mauri & Bosma 2012).

Het model van Mauri en Bosma suggereert echter dat niet de FO B-cel maar de transitionele type 2-marginale zone voorloper B-cel (T2-MZP B-cel) de voorloper is van de Breg. Deze aanname is

gebaseerd op de observatie dat merkers op de Bregs veelal overeenkomen met de merkers op deze B-cel. Tevens zijn T2-MZP B-cellen een ongematureerde groep B-cellen welke geprogrammeerd zijn om snel te reageren op triggers uit de omgeving en ze zijn autoreactief. Tevens heeft onderzoek aangetoond dat het overbrengen van naïeve T2-MZP bepaalde auto-immuunziekten zoals SLE onderdrukken. De 2-stapsgewijze activatie van IL-10 productie verloopt vergelijkbaar met het model dat Lampropoulou voorstelde, echter in het model van Mauri en Bosma heeft de CD80-CD86 interactie ook een stimulatorische functie. Beide modellen hebben beperkingen. Het ene model kan het andere model niet uitsluiten en mede daardoor kunnen ze dé titel van voorloper Breg niet claimen.



Figuur 1: Mogelijk differentiatieproces van T2-MZP B-cellen in het perifere immuunsysteem. T2 B-cellen differentiëren in MZ, FO of T2-MZP regulatoire B-cellen. Via activatie van TLR4, CD40 en de BCR produceren deze cellen IL-10. Nog onbekend is of deze cellen ook TGF-β produceren (Mauri & Ehrenstein 2009).

In de vorige twee modellen wordt er een specifiek type B-cel aangewezen welke verantwoordelijk is als voorloper van de Breg. Meseda et al. geven aan dat Bregs overlappende celoppervlakte markkers met verscheidene andere B-cel subtypen bezitten, consistent met hun locatie in de follicels in de milt en marginale zones. Toch valt er volgens hen niet te bewijzen dat de Breg een specifieke voorloper heeft die verantwoordelijk is voor de IL-10 afhankelijke immuunregulering. Dit model is gebaseerd op de in vitro stimulatie van B-cellen via LPS, PMA en ionomycine, welke vervolgens exclusief IL-10 gingen produceren. Deze variant wordt de B10 cel genoemd, wat tegenwoordig te karakteriseren valt als een subtype Breg (Maseda et al. 2012). Deze B10 cel wordt gekarakteriseerd als CD1d_{hi}CD5₊ (Noh et al. 2011). Volgens dit model reageren proB10 cellen op antigenen en/of TLR signalen waardoor ze IL-10 gaan produceren. Ook hebben zij aangetoond dat deze Bregs ook normaal ontwikkelen in afwezigheid van T-cellen, wat impliceert dat veel proB10 cellen ook reageren op T-celonaafhankelijke antigenen en dus hoogstwaarschijnlijk geen product van reacties in de kiemcentra zijn. Zij sluiten overigens niet uit dat sommige Bregs niet hun oorsprong kunnen hebben in kiemcentra (Maseda et al. 2012).

Vanwege de hoge plasticiteit van lymfocyten is er een tamelijk nieuwe kijk ontwikkeld die suggereert dat Bregs en effector B-cellen uit dezelfde voorloper ontstaan. Dit zou betekenen dat elke effector B-cel herprogrammeerbaar is en afhankelijk van de omgeving kan veranderen in elke gewenste effector B-cel. Als 'omgeving' wordt hierin gesuggereerd dat elke effector cel afhankelijk is van een bepaalde set van gesecreteerde en membraangebonden signalen. Dit model werpt een heel nieuwe kijk op de organisatie van het immuunsysteem omdat het geen onderscheid meer maakt in oorsprong of verschillende typen B-cellen, maar het bekijkt als één populatie welke afhankelijk is van signalen van de omgeving om zo een optimale respons te creëren (Matzinger & Kamala 2011).

Moleculen betrokken bij de differentiatie van Bregs

Nu er verschillende modellen zijn behandeld en de kans bestaat dat er waarschijnlijk geen definitieve subset van regulatoire B-cellen bestaat (Gray & Gray 2010) wordt het tijd in te zoomen op de moleculen betrokken bij de differentiatie en activatie van regulatoire B-cellen. Alom wordt de betrokkenheid van de TLR aangetoond als de eerste stap om de IL-10 productie op gang te zetten. Tevens wordt consistent aangegeven dat verdere activatie via CD40 ook essentieel is. Zowel voor BCR stimulatie als CD80-CD86 interacties zijn de resultaten echter niet eenduidig.

TLR

Toll-like receptoren zijn membraangebonden en intracellulaire moleculen welke microbes (antigenen) herkennen en in de cel een signaaltransductie cascade in gang zetten. De stimulatie van B-cellen met bepaalde TLR-agonisten zet de cel aan tot de productie van een scala aan cytokines. Afhankelijk van het type TLR dat geactiveerd wordt kan de B-cel bepaalde cytokines produceren. Mensen bezitten tenminste 12 verschillende typen TLRs welke zowel de aangeboren als het adaptieve immuunsysteem kunnen stimuleren (Lampropoulou et al. 2008). Daarnaast kan cellulaire activatie via TLRs zorgen voor het doorbreken van tolerantie en auto-immuun processen activeren (Mauri & Bosma 2012). MyD88, een signaal molecuul betrokken bij de signaaltransductie van met name TLRs, speelt hierin een grote rol. Toch werd aangetoond dat sommige TLRs, zoals TLR-9, ook een positieve werking kunnen uitoefenen op het onderdrukken van auto-immuunziekten. Onderzoek toont aan dat bepaalde TLRs betrokken zijn bij de eerste stap van het activatie proces in B-cellen dat leidt tot de productie van IL-10. Zowel de expressie van TLR-4 via de TLR-4 ligand LPS, als TLR-9 via de TLR-9 ligand CpG induceren de expressie van IL-10 in Bregs. TLRs in hun algemeenheid hebben dus eigenlijk een dualistische werking.

Ook de aanwezigheid van MyD88 is cruciaal in het activatieproces. Opvallend aan MyD88 is dat signalering via dit molecuul alleen in B-cellen ziekteonderdrukkend werkt, terwijl dit in andere celtypen juist ziektestimulerend werkt. Daarnaast kan de betrokkenheid van CpG, een TLR9-ligand, tot een grotere productie van IL-10 leiden. Afhankelijk van de variatie in de CpG, kan het de B-cel aanzetten tot of IFN- γ of IL-10 productie. Type A(D) CpG promoot de productie van IFN- γ en type B(K) CpG promoot IL-10 productie. Verschillende TLR9-liganden, net als TLRs zelf, kunnen dus een immuunstimulerende of onderdrukkende werking uitoefenen. Wanneer de B-cel aangezet is tot de productie van IL-10, zal deze het ontstekingsproces onderdrukken door de Th1- en Th17-cellen af te remmen in hun werking (Lampropoulou et al. 2008). Opmerkelijk is dat ander onderzoek heeft aangetoond dat Th17-cellen nogal ongevoelig zijn voor IL-10 (Klinker & Lundy 2012). Nog merkwaardiger is dat onderzoek aan de samenhang tussen Tregs en Bregs aantoont dat de aanwezigheid van Bregs de Th17-cel populatie verhoogt. Deze resultaten suggereren dat IL-10 hier niet verantwoordelijk voor is, maar dat het wel te maken heeft met de aanwezigheid van de regulatoire B-cel.

BCR

De betrokkenheid van de BCR bij de differentiatie van regulatoire B-cellen wordt sterk in twijfel getrokken. Dit grote verschil is duidelijk zichtbaar in studies die verschillen in onderzoek naar een ander subtype Breg. Meerdere studies aan het subtype B10 tonen aan dat de TLR, CD40 en ook de BCR individueel niet genoeg zijn om de cel aan te zetten tot een redelijke productie van IL-10. Juist de stimulatie van de moleculen in combinatie zorgen voor de benodigde IL-10 productie (Maseda et al. 2012). Activatie van TLR-4/9, CD40 en BCRs zouden de cel activeren tot regulatie. Deze regulerende effecten worden daarna gemedieerd door IL-10 (Lemoine et al. 2009). Hetgeen wat ook het model van Lampropoulou ondersteunt. Een ander onderzoek toont aan dat de BCR belangrijk is bij de ontwikkeling van de B10 cel. Wanneer dit signaal afwezig was daalde het aantal van B10 cellen aanzienlijk (Noh et al. 2009). De meeste studies aan de T2-achtige Breg of de T2-MZP B-cel tonen aan de BCR geen of soms zelfs een negatief effect heeft tijdens het differentiatieproces. Onderzoek aan een T2-achtige B-cel toonde aan dat gecombineerde stimulatie via CD40 en de BCR leidde tot een

verlaging in IL-10 productie in vergelijking met wanneer de T2 B-cel alleen werd gestimuleerd door CD40 (Blair et al, 2009). Een onderzoek aan de T2-MZP B-cel toonde aan de costimulatie van CD40 en de BCR receptor zelfs leidde tot de productie van ontstekingsstimulerende cytokines zoals IL-6 en TNF α . In vreemd contrast stond hiermee een parallel onderzoek waarbij deze costimulatie leidde tot een breder spectrum van cytokine productie, waar IL-10 ook toe behoorde (Mauri & Ehrenstein 2009).

CD40-CD40l

CD40 is een costimulatorisch molecuul wat tot expressie wordt gebracht op B-cellen en zorgt voor activerende signalen wanneer deze de CD40ligand bindt die tot expressie wordt gebracht op T-cellen. Deze binding is een belangrijk onderdeel in de immuunregulatie en is een belangrijk component in de "crosstalk" tussen B- en T-cellen (Ray et al. 2011). De aanhechting van onder andere CD40 aan CD40l doet de B-cel differentiëren tot antilichaamproducerende plasmacel. Langdurige aanhechting heeft daarentegen een onderdrukkend effect op de productie van antilichamen. Onderzoek heeft aangetoond dat CD40 een belangrijke component is in het stimuleren van de B-cel tot productie van IL-10. Muizen met een CD40-deficiëntie in hun B-cellen ontwikkelde een ernstigere vorm van EAE en hadden een sterk verlaagde productie van IL-10 en zowel een verhoogde Th1- als Th17-respons (Mauri & Bosma, 2012). Lemoine et al. benaderden dit vanuit een ander oogpunt en toonden aan dat stimulatie via CD40, B-cellen RA symptomen onderdrukken aan de hand van IL-10 productie. Met verder onderzoek werd aangetoond dat wanneer alle CD4+ T-cellen bij een populatie werden verwijderd, de CD40 gestimuleerde B-cellen niet in staat bleken RA te voorkomen (Lemoine et al. 2009). De betrokkenheid van CD40 lijkt tegenstrijdig omdat dit in eerste instantie de B-cel differentieert tot plasmacel. Bepaalde onderzoeken doen vermoeden dat de uitkomst van de aanhechting van CD40 op B-cellen afhankelijk is van het rijpingsstadium van de B-cel en de duur en sterkte van de onderlinge signalen tussen de B- en T-cel wat het lot bepaald of de B-cel differentieert tot Breg of plasmacel (Mauri & Ehrenstein 2009).

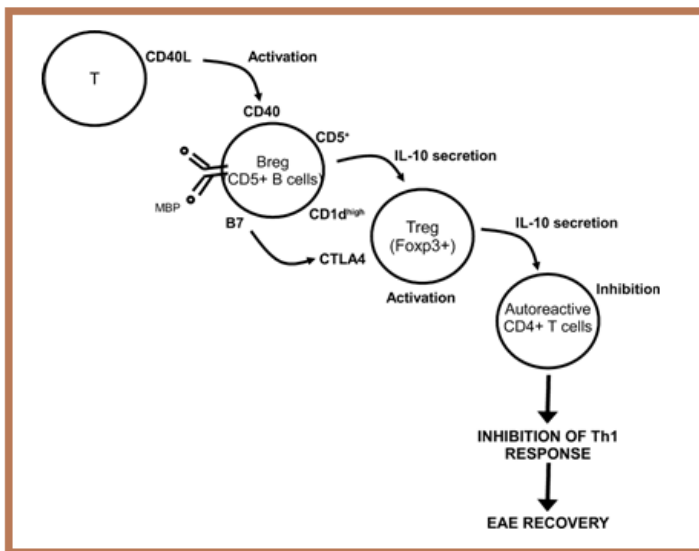
CD80-CD86

De interactie tussen CD40 en de CD40ligand wordt weer gekarakteriseerd door de costimulatie van CD28 door de binding aan CD80 of CD86 op B-cellen (Ray et al. 2011). Onderzoek in het EAE model heeft aangetoond dat deze costimulatie essentieel is voor de B-cel gemedieerde onderdrukking van EAE (Mauri & Ehrenstein 2009). Toch is dit één van de weinige voorbeelden en blijkt nader onderzoek in andere auto-immuun modellen andere resultaten op te leveren. De betrokkenheid van CD80-CD86 in de stimulatie van Bregs blijft tot nu toe niet eenduidig. Of CD80-CD86 nou wel of geen rol speelt in de differentiatie van regulatoire B-cellen, ze spelen wel een rol bij de differentiatie van regulerende T-cellen.

Samenhang tussen Bregs en Tregs

Nu kunnen regulatoire B-cellen direct immuunresponsen onderdrukken, maar daarnaast is het zeer waarschijnlijk dat een gedeelte van de immuunonderdrukkende functie gemedieerd wordt via interacties met andere cellen (Klinker & Lundy 2012). Zo is naast de ontstekingsonderdrukkende werking van IL-10, dit cytokine ook verantwoordelijk voor het behouden van de Foxp3-expressie in Tregs en hiermee de Treg-functie. Tregs kunnen tevens zelf ook IL-10 produceren (Ray et al. 2011). Effector T-celresponsen op eigen en vreemde antigenen kunnen efficiënt worden gestuurd door Tregs. Onder de Treg-populatie vallen zowel CD4+ T-cellen als CD8+ T-cellen, waarvan de meeste Foxp3 tot expressie brengen. Dendritische cellen presenteren constant eigen en vreemde antigenen in het lichaam en met behulp van Tregs zijn ze in staat tolerantie te behouden (Takakubo & Konttinen 2012). Het falen van Tregs in het behouden van de tolerantie resulteert vaak in auto-immuun gerelateerde ziekten. Tregs zijn in tegenstelling tot Bregs veel beter gekarakteriseerd en er bestaat een duidelijker onderscheid in de verschillende typen Tregs. Een bepaald type Treg differentieert in secundaire lymfoïde organen van naïeve Treg tot adaptieve Treg (aTreg). Welke rol deze cellen

precies spelen is nog niet helemaal duidelijk. Ze onderdrukken in ieder geval autoagressieve reacties en ze stimuleren het herstel van weefsel homeostase via TGF- β of door de stimulering van B- en T-geheugencellen via IL-10. Aangezien niet alle auto-immuun T-cellen door het centrale tolerantie mechanisme zijn opgeruimd, spelen aTregs een grote rol in het behouden van de perifere tolerantie door het reguleren van deze overgebleven T-cellen. Afhankelijk van verschillende modelstudies worden autoreactieve B-en T-cellen, dendritische cellen, macrofagen en Tregs gereguleerd door Bregs (Takakubo & Konttinen 2012). Het IL-10, geproduceerd door Bregs, is echter niet voldoende om Tregs direct te induceren maar heeft ook de interactie van CD28 aan CD80-CD86 nodig. Tevens is de aanwezigheid van Bregs nodig om de verhouding tussen Tregs en Tr1- en Th17-populaties te reguleren. De afwezigheid van Bregs verlaagt het aantal Tregs en verhoogt de aantallen Tr1- en Th17-cellen in muismodellen. Onderzoek van Mauri en Bosma toonde aan dat alleen het toedienen van T2-MZP B-cellen, en niet MZ of FO B cellen, in staat zijn het aantal Tregs te verhogen. Onderzoek aan datzelfde type B-cel toonde aan dat in een experimenteel allergisch muismodel T2-MZP Bregs longinfiltraten van CD4+CD25+Foxp3+ Tregs induceerde, wat de ontsteking in de longen klaarde (Mauri & Bosma,2012). Het inzicht in de relatie tussen Bregs en Tregs is de laatste jaren gegroeid en is nog steeds groeiende.



Figuur 2: In deze afbeelding wordt de regulatoire B-cel door activatie van o.a. CD40 en de BCR aangezet tot de productie van IL-10. IL-10 zorgt weer voor het behoud van de Foxp3+ expressie van de Treg. De Treg is geactiveerd en produceert nu ook IL-10, wat de autoreactieve CD4+ T-cel onderdrukt. De Th1-respons wordt onderdrukt en hierdoor ontstaat er herstel van EAE (Lemoine et al. 2009).

Onderzoeksvoorbeelden

De behandeling van de meeste reumatische auto-immuunziekten, zoals SLE en RA, is voor een groot deel afhankelijk van corticosteroiden en cytotoxische immuunsuppressiva. Ondanks dat deze behandeling de overlevingskans heeft verhoogd is de kans op terugval hoog en hebben deze patiënten nog aanzienlijk veel last van hun ziekte (Engel et al. 2011). Ook voor ziekten zoals Multiple sclerose zijn er nog geen effectieve behandelingen ontwikkeld. Het ultieme doel is het herstellen van de tolerantie tegen "zelf"-antigenen (Takakubo & Konttinen 2012). De vraag naar meer inzicht in de pathofysiologie van auto-immuunziekten en een effectievere en veiligere behandeling is dan ook hoog. Aangezien de B-cel in grote mate verantwoordelijk is voor de pathofysiologie van bepaalde auto-immuunziekten heeft men in sommige gevallen B-celdepletie therapie toegepast als lange termijn behandeling in patiënten. Sinds de ontdekking van de regulatoire B-cel en de implicaties die deze cellen kunnen hebben, probeert men naar andere alternatieven te zoeken. De implicatie van een algehele B-celdepletie therapie houdt immers in dat de regulatoire B-celfuncties komen te vervallen. Het behouden van deze immuunonderdrukkende functies en het elimineren van B-cel immuunstimulerende functies zou een betere therapie opleveren.

MS wordt voornamelijk gemedieerd door T-cellen, SLE daarentegen wordt voornamelijk gemedieerd door autoreactieve B-cellen en RA wordt zowel door T-cellen en B-cellen gemedieerd. Omdat Bregs

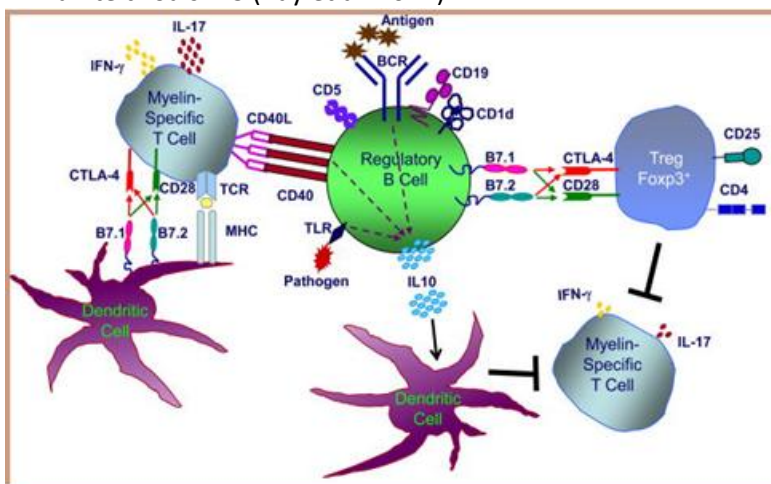
de cellulaire en humorale respons zouden moeten beïnvloeden wordt toch in elk van deze ziekten het belang van regulatoire B-cellen verwacht.

In principe zijn de verschillende typen B-cellen nauw gekarakteriseerd en bezitten een eenduidige functie. Voor de Breg lijkt dit niet zo te zijn. In het voorgaande deel is al aangetoond dat meerdere moleculen een belangrijke rol spelen in de activatie van regulatoire B-cellen. Een logische aanname zou zijn dat wanneer bij een bepaalde B-cel alle juiste omstandigheden hebben plaatsgevonden in de ontwikkeling tot Breg, deze cel in elke situatie dezelfde onderdrukkende functie zal uitoefenen. Dit blijkt echter niet het geval. Gezien de complexiteit van de Breg en auto-immuunziekten blijken deze regulatoire B-cellen in verschillende auto-immuunziekten soms wel en soms ook niet in staat hun immuunonderdrukkende werking uit te oefenen. De Breg kan haar capaciteit tot onderdrukking verliezen en kan zelfs in bepaalde gevallen autoreactief worden (Ray et al. 2011). Aan de hand van onderzoek aan MS, RA en SLE zullen er verschillende onderzoeksvoorbeelden toegelicht worden.

Multiple sclerosis

Aangezien MS voornamelijk via T-cellen gemedieerd wordt, heeft de Breg als belangrijk aangrijppingspunt het moduleren van de T-celrespons en de antigeen-presenterende functies van dendritische cellen. Dat bij Bregs zowel in EAE als in MS de functie behouden bleef, is aangetoond doordat deze cellen hun vermogen om IL-10 te produceren niet hadden verloren (Ray et al. 2011). Ander onderzoek toonde aan dat in muismodellen waarbij B-celdepletie therapie was toegepast, het chronische verloop van EAE werd verergerd. Hetzelfde fenomeen werd geconstateerd in muizen met een aangeboren B-celdeficiëntie. Het toepassen van depletie therapie vóór het induceren van EAE resulteerde in een verergerde vorm van EAE. Echter het toedienen van B10 cellen voorkomt deze verergerde vorm. Een logische suggestie zou zijn dat Bregs specifiek reageren op antigenen van het MBP eiwit. (Luc Van Kaer 2011) Opmerkelijk is dat TLR- 4,9 de IL-10 productie van B-cellen kan induceren, maar dat alleen de expressie van TLR-2,4 de regulatie van het herstelproces van EAE kan bewerkstelligen. Muizen met een TLR-2,4 deficiëntie op B-cellen ontwikkelen een chronische vorm van EAE (Mauri & Bosma 2012). Het herstelproces bij EAE werd gemedieerd door de reductie van de cytokineproductie door DC's, maar had daarentegen geen enkele uitwerking op de T-celproliferatie (Lampropoulou et al. 2008). Wanneer T-cellen in de aanwezigheid van IL-10 worden geactiveerd, worden ze anergisch en produceren ze geen effector-cytokines.

Hoe effectief dit werkt in MS is moeilijker te bevatten. Het is namelijk nog onzeker of bacteriële infecties een actieve rol spelen in MS. De stimulatie van B-cellen in MS patiënten met TLR-9 induceert minder IL-10 dan wanneer men B-cellen in EAE proefdieren met TLR-9 stimuleert. Wat hieruit wordt gesuggereerd is dat infecties wel een rol spelen en de IL-10 productie verlagen. Er is dus een mogelijkheid dat het verschil in IL-10 tussen beide modellen wordt veroorzaakt door bacteriële infecties, maar aangezien het EAE model beperkingen heeft en niet volledig te vergelijken is met MS zou het ook een andere oorzaak kunnen hebben. Daarnaast bestaan er ook infecties die een Th2-respons uitlokken, wat juist weer een gunstig effect heeft op de onderdrukking van auto-immuniteit zoals MS (Ray et al. 2011).



Figuur 3: Deze afbeelding geeft een mogelijke regulatoire werking in MS weer. De DC fungeert hier als APC aan de myeline-specifieke T-cel. Zowel de stimulatie via CD40-CD40L, de TLR en de BCR zet de regulatoire B-cel aan tot IL-10 productie. Dit remt de antigeen presentatie van de DC waardoor de myeline-specifieke T-cel wordt geremd in proliferatie en cytokine productie. Door de "crosstalk" tussen de Breg en de Treg, wordt tevens de myeline-specifieke T-cel functie en overleving onderdrukt (Ray et al. 2011).

Reumatoïde artritis

In reumatoïde artritis is er een bepaald type autoantilichaam B-cel klonen ontdekt dat voor een groot deel de duur van de ziekte bepaald. Deze B-cellen produceren onder andere grote hoeveelheden ontstekingsstimulerende cytokines zoals IL-6 en TNF α , welke op hun beurt weer macrofagen en T-cellen activeren. Daarnaast produceren ze in grote hoeveel een molecuul genaamd RF, een groep auto-antilichamen genaamd reumafactor. Het molecuul BAFF (B-cel activating factor), wat wordt geproduceerd door monocytten en dendritische cellen, speelt een belangrijke rol in de pathogenese van RA. In vivo heeft BAFF een belangrijke functie als regulator van B-cel homeostase. Excessieve BAFF productie kan leiden tot de ontregeling van de homeostase en kan wellicht het opkomen van autoreactieve B-cellen promoten. In reactie op BAFF gaan deze B-cellen veel IL-10 produceren en IL-10 verhoogd weer de productie van BAFF. Zo ontstaat er een negatieve terugkoppeling die de auto-immuunziekte verergert (Nakken et al. 2011). Toch heeft onderzoek aangetoond dat regulatoire B-cellen, na stimulatie met CD40, in staat waren de inductie van artritis te onderdrukken door middel van IL-10 (Takakubo & Konttinen 2012). Wellicht hebben de Bregs, net als bij SLE, ook wel in RA hun onderdrukkende functies verloren. In veel onderzoeksmodellen zijn de regulatoire B-cellen niet in staat een positief effect uit te oefenen op de klaring van ontstekingen in RA. B-celdepletie therapie blijkt nog steeds een gunstig effect uit te oefenen in RA. Waarschijnlijk omdat de negatieve effecten van B-cellen de positieve effecten van de regulatoire B-cellen overschaduwden.

Systemische lupus erythematoses

De centrale immunologische afwijking in SLE is de productie van autoantilichamen door autoreactieve B-cellen. Deze autoantilichamen reageren onder andere tegen dsDNA, het RNA-molecuul/eiwitcomplex Sm en ribonucleoproteïnes (Burness & McCormack 2011). De B-celactivatie is dan ook abnormaal in SLE en B-cellen zijn dan ook gevoeliger voor stimulatie van cytokines. De abnormale functies van T-cellen worden ook veroorzaakt door de aanwezige autoantilichamen. (Mok & Lau 2003) IL-10 heeft net als bij RA een nogal tegenstrijdige werking in SLE. Patiënten vertonen een hoog serumniveau van IL-10 wat positief correleert met SLE activiteiten. Het toedienen van anti-IL-10 monoklonale antilichamen aan patiënten resulteerde dan ook in een positief klinisch effect. Verder werd aangetoond dat door middel van het onderdrukken van IL-10 de cel-gemedieerde immuunresponsen werden gestimuleerd wat voordelen opleverde voor deze patiënten, IL-10 verslechtert immers ook de antigeenpresentatie en Th1-lymfocytactivatie (Takakubo & Konttinen 2012) (Mok & Lau 2003). In SLE verloopt de B-celactivatie abnormaal, wat de hoge IL-10 waardes zou kunnen verklaren. Tevens kan dit ook verklaren waarom er disfunctionele Bregs aanwezig zijn in SLE. In principe heeft de Breg haar onderdrukkende functie te danken aan IL-10 productie. De disfunctionaliteit van Bregs kan meerdere oorzaken hebben. Er kunnen bijvoorbeeld te weinig signalen worden doorgegeven aan de cel om genoeg IL-10 te produceren. De cel kan ook ongevoelig zijn voor bepaalde stimulatie. Bepaalde Bregs, geïsoleerd uit het perifere bloed, waren bijvoorbeeld ongevoelig voor CD40-stimulatie en produceerden lage concentraties IL-10 en miste daardoor hun onderdrukkende werking (Nakken et al. 2011). Ander onderzoek toonde aan dat Bregs in patiënten met SLE pas verslechterde functies vertoonden nadat ze met CD40 werden gestimuleerd (Engel et al. 2011). Signalering via CD40 komt namelijk nogal precies omdat het moment van signalering en de duur ervan bepalend zijn.

Opmerkelijk is dat zowel RA als SLE patiënten een verhoogde expressie hebben van IL-10 wat de progressie van de ziekte verergert. Men zou verwachten dat de hoge IL-10-waardes aanwezig in SLE (en ook bij RA) patiënten niet afkomstig zijn van regulatoire B-cellen, maar een andere oorsprong hebben. IL-10 is immers zowel een ontstekingsremmende als stimulerende factor.

Discussie & Speculatie

Er is nog relatief weinig bekend aangaande regulatoire B-cellen. Elk ander type B-cel is goed gekarakteriseerd en heeft een vrij afgebakende functie. Dit geldt simpelweg niet voor de Breg, omdat deze een hoge plasticiteit heeft en een andere vorm en functie kan aannemen afhankelijk van de omgeving. De vraag of Bregs een voorloper B-cel bezitten is ook nog niet beantwoord. Zowel in vitro als in vivo onderzoek aan het type B10 als het de T2-MZP zijn er overtuigende resultaten gekomen dat het voorloper Bregs zouden kunnen zijn en wellicht bestaat er dus geen één enkele voorlopercel, maar meerder subtypen Bregs met verschillende voorlopercellen. Er is geen unieke merkerset dat Bregs definieert en daarom is er op dit moment nog geen model van oorsprong uitsluitbaar. Een andere suggestie zou zijn dat Bregs op zichzelf helemaal niet bestaan en dat bepaalde B-cellen, onder de juiste omstandigheden, simpelweg regulerende functies kunnen uitoefenen. Voor elk van deze aannames valt het één en ander te zeggen. In het vorige deel zijn hierover vier modellen toegelicht en daaruit zijn drie mogelijk voorloper Bregs gekomen. Uit geen van alle kan met zekerheid geconcludeerd worden dat de Breg uit één voorlopercel ontstaat. Dus of er bestaan meerdere subtypen Bregs, of B-cellen zijn in het algemeen heel plastisch en herprogrammeerbaar en kunnen zo in elke gewenste effector B-cel veranderen. Het model van Matzinger & Kamala is echter nogal progressief en tegenstrijdig met alles wat men nu denkt te weten over immunologie. Het is aangaande Bregs lastig hier verder onderzoek aan te doen, omdat het fundament van de immunologie niet is gebaseerd op deze aanname.

Nu is de functie van Bregs daadwerkelijk afhankelijk van geassocieerde moleculen betrokken bij de differentiatie. Men heeft aangetoond dat de TLRs, CD40 en de BCR in ieder geval betrokken zijn bij de stimulering van de B-cel tot IL-10 productie. Ook al speculeert men nog over de betrokkenheid van de BCR, onderzoek heeft wel aangetoond dat ze betrokken zijn, wellicht bij het ene B-celtype wel en het andere niet. Feit blijft dat er geen consensus is bereikt over de oorsprong van Bregs en daardoor zal de betrokkenheid van sommige geassocieerde moleculen twijfelachtig blijven. Een voetnoot is echter, dat er ook een tegengesteld effect schuilt achter deze stimulatie. IL-10 kan immuunonderdrukkend of stimulerend werken en ditzelfde geldt voor de betrokkenheid van de TLR en CD40. Hierdoor wordt het moeilijk het proces in een bepaalde richting te sturen, Bregfunctie is afhankelijk van veel variabelen. Daarbij komt dat er ontzettend veel omgevingsfactoren zijn, zoals bepaalde bacteriële infecties of virussen etc., die specifieke lymfocyt-responsen kunnen oproepen waar ook Treg- en Breg-functie gevoelig voor kunnen zijn. Waarschijnlijk spelen infecties ook een grote rol in MS. Hoe dit precies verloopt is nog onduidelijk.

Een ander aspect van differentiatie is dat aangezien alle B-cellen IL-10 kunnen aanmaken, bepaalde stimuli van B-cellen afhankelijk zijn van de juiste tijd en context. Het blijkt dat de optimale tijd van IL-10 productie 48 uur na stimulatie plaatsvindt, echter verschillende typen B-cellen kunnen wellicht optimaal reageren onder andere omstandigheden en andere fases van maturatie (Gray & Gray 2010). Als men ervan uit gaat dat bepaalde typen B-cellen regulerende functies kunnen uitoefenen zou dit de hoge plasticiteit, welke bij deze regulerende werking wordt waargenomen, kunnen verklaren.

IL-10 is een pleiotroop cytokine, welke een grote rol uitoefent in de progressie van auto-immuunziekten. Zo is het betrokken bij de Th2-respons waarbij B-cellen worden aangezet tot proliferatie en de productie van antilichamen. Tevens is een verhoogde expressie van IL-10 waargenomen bij SLE, wat de ziekte verergert. In beide gevallen heeft IL-10 hier dus een ontstekingsstimulerende werking. De bron van IL-10 is tevens in deze gevallen in ieder geval niet de regulatoire B-cel. Blijkbaar ligt hier dus het fundamentele verschil aangaande de werking van IL-10. IL-10 afkomstig van Bregs heeft een onstekingsonderdrukkende werking. In de Th2-respons is IL-10 afkomstig van Th2-cellen en wellicht is de hoge productie van IL-10 in SLE patiënten afkomstig van de autoreactieve B-cellen. In deze beide situaties werkt IL-10 ontstekingsstimulerend.

Nu is het verband tussen IL-10 producerende Bregs en de immuunonderdrukkende werking aangetoond, maar dit wil echter nog niet meteen zeggen dat er ook een verband bestaat tussen de hoeveelheid geproduceerde IL-10 en de mate waarin regulatoire B-cellen immuunonderdrukkend kunnen werken. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat er een soort drempelwaarde bestaat. Stimulatie via de TLR levert immers een nog te lage productie van IL-10 op en pas na stimulatie via CD40 en de BCR was de productie van IL-10 hoog genoeg voor de Breg om de onderdrukkende functie uit te oefenen.

Is er sprake van een alomvattende immuunonderdrukkende werking van Bregs in auto-immuunziekten of is dit te wijten aan geassocieerde moleculen betrokken bij Breg differentiatie? Teruggaand op deze onderzoeksvraag, kan men de redelijke aanname maken dat deze geassocieerde moleculen daadwerkelijk verantwoordelijk zijn voor de immuunonderdrukkende functies van Bregs. Dat deel van de onderzoeksvraag is in ieder geval waar. Maar als we nader gaan kijken naar onderzoek aan auto-immuunziekten lijkt dit antwoord niet helemaal te volstaan.

Het blijkt dat de aard van de ziekte veel invloed kan uitoefenen op het wel of niet functioneren van regulatoire B-cellen. Dit hoeft in principe niet afhankelijk te zijn van de geassocieerde moleculen betrokken bij de differentiatie van Bregs. In SLE is aangetoond dat Bregs hun onderdrukkende werking niet of niet meer bezitten. Dit kan betekenen dat er tijdens het differentiatieproces wat is fout gegaan, of ze hebben gaandeweg hun functie verloren, nadat ze volledig zijn gedifferentieerd. Hier moet nog vervolg onderzoek naar worden gedaan. In dit soort situaties blijkt algehele B-celdepletie het beste te werken, ook al gaan hiermee de regulatoire B-cellen ook verloren. De beste manier houdt in dat er in dit soort patiënten een gerichte B-celdepletie wordt toegepast of dat regulatoire B-cellen hiervan worden uitgesloten. Hier moet men echter de functie en vorm van Bregs voor kunnen karakteriseren.

Conclusie

B-cellen, ongeacht het type, kunnen immuunonderdrukkend werken. Of ze dan ook regulatoire B-cellen mogen worden genoemd is de vraag. Uit onderzoek aan auto-immuunziekten blijkt dat er zijn te veel variabelen aanwezig zijn. Misschien moet niet worden aangenomen dat B10, FO of T2-MZP B-cellen regulatoire B-cellen zijn, maar dat deze typen B-cellen regulerende functies kunnen uitoefenen. Eerder gezegd is dat normaal gesproken, in de immunologie, er alleen nieuwe typen immuuncellen gelanceerd worden wanneer ze een unieke set van celmarkers bezitten die hun functionaliteit definieert of dat ze een gedefinieerde transcriptiefactor bezitten dat de ontwikkeling en functie karakteriseert. Bregs bezitten geen van deze functies (Gray & Gray 2010). Er is dus geen sprake van een alomvattende onderdrukkende werking van Bregs in auto-immuunziekten. De onderdrukkende werking hebben B-cellen te danken aan geassocieerde moleculen betrokken bij de differentiatie. En dan nog bestaan er tegenstrijdigheden in bijna al deze moleculen. Daarnaast speelt het type auto-immuunziekte een grote rol bij de werking van deze Bregs.

Het onderzoek naar regulatoire B-cellen staat nog in de kinderschoenen. Veel van de resultaten zijn nog niet eenduidig. Het is dan ook belangrijk om verder onderzoek te doen naar de precieze functie en werking van Bregs en uit te zoeken wat voor voorlopercellen ze precies bezitten. Tevens is het relevant om uit te zoeken hoe de dualistische werking van bijvoorbeeld de TLR en CD40 nou precies Bregs beïnvloeden. Antwoorden op dit soort vragen stelt de wetenschap misschien in staat regulatoire B-cellen in patiënten met auto-immuunziekten zo te manipuleren opdat de onderdrukkende functie geïnitieerd wordt en behouden blijft.

Literatuurlijst

- Blair, P.A., K.A. Chavez-Rueda, J.G. Evans, M.J. Shlomchik, A. Eddaoudi, D.A. Isenberg, M.R. Ehrenstein, C. Mauri (2009) "Selective targeting of B cells with agonistic anti-CD40 is an efficacious strategy for the generation of induced regulatory T2-Like B cells and for the suppression of lupus in MRL/lpr mice", *The Journal of Immunology*, jrg. 182, nr. 6, pp. 3492-3502.
- Burness, C.B. en P.L. McCormack (2011) "Belimumab in systemic lupus erythematosus", *Drugs*, jrg. 71, nr. 18, pp. 2436-2444.
- Engel, P., J.A. Gómez-Puerta, M. Ramos-Casals, F. Lozano, X. Bosch (2011) "Therapeutic targeting of B cells for rheumatic autoimmune diseases", *Pharmacological Reviews*, jrg. 63, nr. 1, pp. 127-156.
- Gray, D., en M. Gray (2010) "What are regulatory B cells?", *European Journal of Immunology*, jrg. 40, nr. 10, pp. 2677-2679.
- Klinker, M.W. en S.K. Lundy (2012) "Multiple mechanisms of immune suppression by B lymphocytes", *Molecular Medicine*, jrg. 18, nr. 1, pp. 123-137.
- Lampropoulou, V., K. Hoehlig, T. Roch, P. Neves, E. Calderón Gómez, C.H. Sweenie, Y. Hao, A.A. Freitas, U. Steinhoff, S.M. Anderton, S. Fillatreau (2008) "TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity", *The Journal of Immunology*, jrg. 180, nr. 7, pp. 4763-4773.
- Lemoine et al. S., A. Morva, P. Youinou, C. Jamin (2009) "Regulatory B cells in autoimmune diseases: how do they work?", *Annals of the New York Academy of Sciences*, jrg. 1173, nr. 1, pp. 260-267.
- Maseda et al. D., S.H. Smith, D.J. DiLillo, J.M. Bryant, K.M. Candando, C.T. Weaver, T.F. Tedder (2012) "Regulatory B10 cells differentiate into antibody-secreting cells after transient IL-10 production in vivo", *The Journal of Immunology*, jrg. 188, nr. 3, pp. 1036-1048.
- Matsushita, T., K. Yanaba, J. Bouaziz, M. Fujimoto, T.F. Tedder (2008) "Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression", *The Journal of Clinical Investigation*, jrg. 118, nr. 10, pp. 3420-3430.
- Matzinger, P. en T. Kamala (2011) "Tissue-based class control: the other side of tolerance", *Nature Reviews Immunology*, jrg. 11, nr. 3, pp. 221-230.
- Mauri, C. en A. Bosma (2012) "Immune regulatory function of B cells", *Annual Review of Immunology*, jrg. 30, nr. 1, pp. 221-241.
- Mauri, C. en M.R. Ehrenstein (2008) "The 'short' history of regulatory B cells", *TRENDS in Immunology*, jrg. 29, nr. 1, pp. 34-40.
- Mok, C.C. en C.S. Lau (2003) "Pathogenesis of systemic lupus erythematosus", *Journal of Clinical Pathology*, jrg. 56, nr. 1, pp. 481-490.
- Nakken, B., L.A. Munthe, Y.T. Konttinen, A.K. Sandberg, Z. Szekanecz, P. Alex, P. Szodoray (2011) "B-cells and their targeting in rheumatoid arthritis — Current concepts and future perspectives", *Autoimmunity Reviews*, jrg. 11, nr. 1, pp. 28-34.

Noh, G. en J.H. Lee (2011) "Regulatory B cells and allergic diseases", *Allergy Asthma Immunology Research*, jrg. 3, nr. 3, pp. 168-177.

Ray, A., M.K. Mann, S. Basu, B.N. Dittel (2011) "A case for regulatory B cells in controlling the severity of autoimmune-mediated inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis", *Journal of Neuroimmunology*, jrg. 230, nr. 1-2, pp. 1-9.

Takakubo, Y. en Y.T. Konttinen (2012) "Immune-regulatory mechanisms in systemic autoimmune and rheumatic diseases", *Clinical and Developmental Immunology*, jrg. 2012, (nr. 1), pp. 941346-941359.

Van Kear, L. (2011) "Glatiramer acetate for treatment of MS: Regulatory B cells join the cast of players", *Experimental Neurology*, jrg. 227, nr. 1, pp. 19-23.