

**Aus der Kinderklinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. C. P. Speer**

**Charakterisierung peripherer T-Zellpopulationen, regulatorischer T-  
Zellen und Th17 Zellen bei Patienten mit Systemischer Sklerose**

**Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von**

**Matthias Ferdinand Klein  
aus Weilheim in Oberbayern**

**Würzburg, August 2017**

**Referentin:**

Prof. Dr. Martina Prelog

**Korreferent:**

Prof. Dr. Matthias Goebeler

**Dekan:**

Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung: 9.05.2018**

**Der Promovend ist Arzt**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Die Sklerodermie</b>	<b>1</b>
1.1.1	Definition	1
<b>1.2</b>	<b>Systemische Sklerose</b>	<b>1</b>
1.2.1	Klassifikation und Epidemiologie	1
1.2.2	Hautbeteiligung und Raynaud Phänomen	4
1.2.3	Organbeteiligung	5
1.2.3.1	Gastrointestinaltrakt	5
1.2.3.2	Lunge	6
1.2.3.3	Niere	6
1.2.3.4	Herz, Muskulatur und Skelett	7
1.2.4	Therapie	7
1.2.5	Pathogenese	9
1.2.5.1	Vaskuläre Veränderungen:	9
1.2.5.2	Fibroblastenaktivität und Fibrose	10
1.2.5.3	Beitrag der humoralen Immunantwort zur Pathogenese der SSc, Autoantikörper	11
1.2.5.4	Beitrag der T- und B-Zellen zur Pathogenese der SSc	12
<b>1.3</b>	<b>Das Immunsystem</b>	<b>13</b>
1.3.1	Die angeborene Immunität	13
1.3.2	Die adaptive Immunität	14
1.3.2.1	CD8 + T-Zellen	14
1.3.2.2	CD4 + T-Zellen	15
1.3.3	Autoimmunität	18
<b>1.4</b>	<b>Fragestellung der Arbeit</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>21</b>
2.1.1	Antikörper	21
2.1.1.1	Oberflächenantikörper	21
2.1.1.2	Intrazelluläre Antikörper	22
2.1.2	Antibiotika	22
2.1.3	Stimulantien	22
2.1.4	Chemikalien	22
2.1.5	Puffer und Lösungen	23
2.1.6	Plastikwaren	24
2.1.7	Geräte	24
2.1.8	Kits	25
2.1.9	Zellkulturmedien	25
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>26</b>

2.2.1	Studienpopulation und Patientenmaterial:	26
2.2.2	Gewinnung und Lagerung von PBMCs mittels Ficoll Dichtegradientenzentrifugation	26
2.2.3	Einfrieren der PBMC	28
2.2.4	Auftauen der PBMC	28
2.2.5	Färbung der PBMC zur Bestimmung des T-Zell Phänotyps und der intrazellulären Zytokine	28
2.2.6	FACS Analyse der angefärbten PBMCs	31
2.2.7	Durchflusszytometrie und Einstellung des FACS Canto II	31
2.2.8	Carboxyfluorescein-succinimidylester (CFSE) Färbung	32
2.2.9	Isolation von regulatorischen T-Zellen (CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> T-Zellen)	32
2.2.10	Ansatz eines „Suppressionsassays“	34
2.2.11	Messung der Serumzytokinspiegel	35
2.2.12	Statistik	36
<b>2.3</b>	<b>Definition der CD4/CD8+ T-Zell Subpopulationen in dieser Arbeit</b>	<b>37</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>41</b>
<b>3.1</b>	<b>Patientenkollektiv</b>	<b>41</b>
<b>3.2</b>	<b>Vergleich von CD4+ und CD8+T-Zellen, B-, NK- und NK-T-Zellen</b>	<b>43</b>
<b>3.3</b>	<b>CD4+ T-Zellen</b>	<b>44</b>
3.3.1	Verteilung der Naiven-/Memory-/Effektor-/TEMRA-in CD4+ T-Zellen	44
3.3.1.1	Naive CD4+ T-Zellen	44
3.3.1.2	CD4+ Gedächtnis-T-Zellen	45
3.3.1.3	CD4+ Effektor-T-Zellen	46
3.3.2	Chemokinrezeptoren auf CD4+ T-Zellen	49
3.3.3	Intrazelluläre Zytokine der CD4+ T-Zellen	50
3.3.4	Th-17 Zellen	59
3.3.5	Regulatorische T-Zellen	63
<b>3.4</b>	<b>CD8+ T-Zellen</b>	<b>67</b>
3.4.1	Verteilung der Naiven-/Gedächtnis-/Effektor -in CD8+ T-Zellen	67
3.4.2	Chemokinrezeptoren auf CD8+ T-Zellen	69
3.4.3	Intrazelluläre Zytokinproduktion der CD8+ T-Zellen	70
3.4.4	Korrelationen zwischen Chemokinrezeptor Expression und intrazellulärer Zytokinproduktion der CD8+ T-Zellen	82
<b>3.5</b>	<b>Suppressionsassays</b>	<b>82</b>
<b>3.6</b>	<b>Zytokine im Serum</b>	<b>84</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>86</b>
<b>4.1</b>	<b>Größeres inflammatorisches Potential der CD4+ T-Zellen bei Patienten mit SSc</b>	<b>86</b>
<b>4.2</b>	<b>Beitrag der CD8+ T-Zellen zur Inflammation und Fibrose bei SSc</b>	<b>91</b>

<b>4.3</b>	<b>Die Rolle der Th-17 Zellen</b>	<b>95</b>
<b>4.4</b>	<b>Die Rolle der regulatorischen T-Zellen</b>	<b>96</b>
<b>4.5</b>	<b>Perspektiven und Auswirkungen der Arbeit</b>	<b>98</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>100</b>
	<b>ABSTRACT</b>	<b>102</b>
<b>6</b>	<b>PUBLIKATIONEN AUS DATEN DIESER ARBEIT</b>	<b>104</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>105</b>
	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>114</b>
	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>115</b>
	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>116</b>

# **1 Einleitung**

## **1.1 Die Sklerodermie**

### **1.1.1 Definition**

Der Begriff Sklerodermie beschreibt ein Spektrum von Krankheiten, die sich allesamt durch das Vorhandensein von sklerodermiformen Hautveränderungen auszeichnen.[1]

Grundsätzlich können zwei verschiedene Gruppen unterschieden werden. Zum einen lokalisierte Formen, wie z.B. die Morphea, zum anderen die systemische Form mit ausgedehnterem Haut- und auch Organbefall. Es folgt der Überblick über die systemische Form, die Systemische Sklerose (SSc).

## **1.2 Systemische Sklerose**

### **1.2.1 Klassifikation und Epidemiologie**

Für die SSc gibt es immer noch keine Diagnosekriterien. Im Verlauf der letzten Jahrzehnte wurden verschiedene Klassifikationen entwickelt, um Patienten mit dieser Erkrankung zu unterscheiden und zu diagnostizieren.

1980 wurden durch die American Rheumatism Association erste präliminäre Klassifikationskriterien veröffentlicht. Danach kann die SSc als solche klassifiziert werden, wenn entweder das Hauptkriterium, (Sklerodermie proximal der Fingergrundgelenke) oder mindestens 2 von 3 Nebenkriterien (Sklerodaktylie, Narben oder Substanzverluste der distalen Fingerweichteile und bilaterale Lungenfibrose) zutreffen.[2]

Heutzutage wird am häufigsten die deskriptive Beschreibung der SSc von LeRoy et al. aus dem Jahr 1988 in limitiert kutane (lcSSc) und diffus kutane (dcSSc) Form zur Unterscheidung der Patienten verwendet.[3, 4] Eine Übersicht ist in Tabelle 1 gegeben. Diese Einteilung wurde auch in dieser Arbeit verwendet.

Im Jahr 2001 wurde durch LeRoy et al. eine weitere Form der SSc beschrieben: die limitierte, oligosymptomatische SSc (lSSc). Durch neue Erkenntnisse in Kapillarmikroskopie und Autoantikörperdetektion ergaben sich Möglichkeiten, Patienten mit frühen Formen der Erkrankung zu diagnostizieren, auch wenn sie noch

keine Hautveränderungen haben. Danach gilt ein Patient mit dokumentiertem Raynaud-Phänomen und pathologischer Kapillarmikroskopie, sowie SSc-assoziierten Autoantikörpern (z.B. Centromer- oder Topoisomerase I Antikörper) als lSSc-Patient.[4, 5]

Tabelle 1: Klassifikation der dcSSc und lcSSc nach LeRoy et al.[3, 4]

	Diffus kutane Systemische Sklerose	Limitiert kutane Systemische Sklerose
Hautbefall	Stamm <u>und</u> Akren sind betroffen	Limitiert auf Hände, Gesicht, Füße und Unterarme (Akren)
Raynaud-Phänomen	Erst kürzlich vor Auftreten anderer SSc-Symptome aufgetreten	Oft schon jahrelang vorbestehend
Organbeteiligung	Frühes Auftreten von Lungen-, Nieren-, Gastrointestinal- und Herzbeteiligung	Pulmonale Hypertonie (10-15% der Fälle), Hautverkalkungen, Teleangiektasien, Ösophagusmotilitätsstörungen
Kapillarmikroskopie	Dilatierte <u>und</u> destruierte / fehlende Nagelfalzkapillaren	Dilatierte und selten destruierte Nagelfalzkapillaren
Autoantikörper	Anti-Topoisomerase I Antikörper (Scl-70) (30% der Fälle)	Centromer-Antikörper (70-80% der Fälle)

2013 wurden durch das American College of Rheumatology (ACR) und die European League Against Rheumatism (EULAR) neue Klassifikationskriterien für die SSc entwickelt. Ziel war, frühe Formen der Erkrankung mit diskreten oder fehlenden Hautveränderungen besser diagnostizieren zu können.[6]

Ein Scoringsystem wurde entwickelt, bei dem ein Punktwert von  $\geq 9$  zur Klassifikation einer SSc reicht. (siehe Tabelle 2)

Tabelle 2: ACR/EULAR Kriterien zur Klassifikation der Systemischen Sklerose von 2013.[6]

Kriterium	„Sub-Kriterium“	Punktwert
Verdickung der Haut an Fingern beider Hände bis proximal der Metakarpophalangealgelenke		9
Hautverdickungen der Finger (nur der höhere Punktwert zählt)	„Puffy“ Finger	2
	Sklerodaktylie (distal der Metakarpophalangealgelenke)	4
Fingerkuppenläsionen (nur der höhere Punktwert zählt)	Ulcera der Fingerkuppen	2
	Grübchenförmig vernarbende Fingerspitzen	3
Teleangiektasien		2
Pathologische Nagelfalzkapillarmikroskopie		2
Pulmonal-arterielle Hypertonie und / oder interstitielle Lungenerkrankung (maximaler Punktwert 2)	Pulmonal arterielle Hypertonie	2
	Interstitielle Lungenerkrankung	2
Raynaud Phänomen		3
Autoantikörper (maximaler Punktwert 3)	Anticentromer Antikörper	3
	Anti-Topoisomerase I Antikörper (Scl-70)	3
	Anti-RNA Polymerase III Antikörper	3

Die Prävalenz der SSc liegt zwischen 7 - 489 / 1.000.000 Einwohner, wobei es große geografische Abweichungen gab. Zum Beispiel ist die Prävalenz in den USA deutlich höher als in Europa.[7]

Frauen sind in einem Verhältnis von 3:1 gegenüber Männern deutlich häufiger



betroffen. Das Hauptmanifestationsalter liegt etwa in der fünften Lebensdekade. Bei Kindern ist eine SSc sehr selten.

Die Inzidenz beträgt etwa 1 – 19 / 1.000.000 Einwohner/ Jahr. Die Vermutung eines scheinbaren Anstiegs der Inzidenz in den letzten 50 Jahren wird dadurch entkräftet, dass zwischenzeitlich die Klassifikationskriterien deutlich verbessert wurden.[7, 8]

Die standardisierte Mortalitätsrate von Patienten mit SSc beträgt circa 3,5. Dies unterstreicht die schlechte Prognose der Erkrankung. Die häufigste Todesursache stellen die Herz- und Lungenbeteiligung der Erkrankung dar. In den letzten 40 Jahren hat sich die Mortalitätsrate nicht signifikant geändert.[9, 10]

Patienten mit dcSSc haben eine 1,2-fach höhere Mortalitätsrate als lcSSc-Patienten.[11] Ebenfalls sind männliches Geschlecht und ein früher Krankheitsbeginn negative Prognosefaktoren.[12, 13]

### 1.2.2 Hautbeteiligung und Raynaud Phänomen

Das führende klinische Merkmal der SSc sind die Veränderungen der Haut. Meistens beginnen die Veränderungen an den Fingern, den Händen und im Gesicht. Es kommt zunächst oft zu ödematöser Schwellung der Haut („puffy hands“) und in der Folge zur charakteristischen Hautverdickung und Induration.

Charakteristischerweise kommt es an den Fingern zur Ausbildung von dermatogenen Beugekontrakturen mit Verkürzung und Zuspitzung der Fingerendglieder. Ulcera der Fingerendglieder und sogenannte „Rattenbissnekrosen“ treten ebenfalls auf. Im Gesicht kommt es zur Gesichtsverkleinerung, dem Verstreichen der Falten, Mikrostomie und radiärer Mundfältelung (sog. Tabaksbeutelmund). Auffällig sind ebenfalls Teleangiektasien, sowie eine Amimie.[14]

In der Kapillarmikroskopie zeigen sich charakteristische Veränderungen wie z.B. Riesenskapillaren, Verdickung des Nagelfalzes und Ausdünnung der Kapillardichte.[15]

Zur Abschätzung des Ausmaßes des Hautbefalls wurde der sogenannte „*modified Rodnan skin score*“ (mRSS) entwickelt. Dabei werden insgesamt 17 Hautareale des Patienten jeweils klinisch hinsichtlich der Hautdicke beurteilt und mit Werten von 0 bis 3 bewertet. 0 entspricht einer normal dicken, gesunden Haut, 3 einer schweren

Verdickung des Hautareals. Die Summe aller 17 Werte ergibt den „*modified Rodnan skin score*“.

Das Raynaud Phänomen als häufige vaskuläre Veränderung der Erkrankung wird durch einen Gefäßspasmus der versorgenden Gefäße ausgelöst, der in einer Weißverfärbung der Finger bzw. Zehen resultiert. Anschließend folgt eine livide Verfärbung durch die Blutstase, gefolgt von einer reaktiven Hyperämie mit roter Verfärbung der betroffenen Haut. Das Raynaud Phänomen tritt bei SSc Patienten etwa in 90% der Fälle auf, wird aber auch häufig bei gesunden Menschen beobachtet. Patienten mit lcSSc leiden häufig schon sehr lange daran, bei Patienten mit dcSSc beginnt es meist zeitgleich mit anderen Symptomen der SSc und kündigt einen schweren Krankheitsverlauf an. Bei milden Formen des Raynaud Phänomens treten außer Missempfindungen und Schmerzen keine Symptome auf. Bei schweren Fällen können aufgrund von Ischämien Ulzerationen und Nekrosen entstehen.[16-19]

### 1.2.3 Organbeteiligung

Eine extrakutane Organbeteiligung ist im Fall der SSc fast immer zu finden. Betroffen sind der Gastrointestinaltrakt, die Lungen, die Nieren, sowie Herz und Muskulatur.

#### 1.2.3.1 Gastrointestinaltrakt

Durch die SSc kann es in allen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes zu Veränderungen kommen, die sich generell durch Hypomotilität äußern.

Besonders häufig ist in 86% der Patienten der Ösophagus betroffen. Etwa die Hälfte der betroffenen Patienten verspürt dies durch Refluxbeschwerden und Dysphagie, aufgrund von Fehlregulationen der Peristaltik und des unteren Sphinkters.[19]

Am Magen kann sich die Erkrankung durch Entleerungsstörungen durch die Hypomotilität äußern.[20]

Ein gehäuftes Auftreten von Magenblutungen wurde ebenfalls beschrieben. Die Gründe liegen vor allem im Vorhandensein von Teleangiektasien.[21]

Ein Befall des Dünndarms wird in 20 bis 60 % der Patienten beschrieben. Dieser äußert sich klinisch durch reduzierte Peristaltik mit Völlegefühl und Schmerzen. Bakterielle Fehlbesiedelungen und Malabsorption sind auch beschrieben.[22]

Am Dickdarm sind die häufigsten Veränderungen im Bereich des Analkanals und des

Rektums anzutreffen. Abnormale Motilität mit Sphinkterstörungen wurde als genauso häufig wie Störungen der Ösophagusmotilität beschrieben.[23]

#### 1.2.3.2 Lunge

Bezüglich der Lungenbeteiligung muss zwischen zwei verschiedenen Entitäten unterschieden werden: der pulmonal arteriellen Hypertonie und der interstitiellen Lungenerkrankung.

Die interstitielle Lungenerkrankung, also Lungenfibrose, findet sich zu gewissen Anteilen in etwa 50 % der Patienten mit SSc. Es kommt zur Fibrosierung des interstitiellen Lungengewebes und somit zur Verminderung der Compliance. In Lungenfunktionsuntersuchungen äußert sich dieses durch eine restriktive Ventilationsstörung durch Verminderung der Vitalkapazität und Reduktion der Diffusionskapazität. Die Patienten klagen häufig über zunehmende Luftnot und trockenen Husten. Patienten mit dcSSc sind deutlich häufiger betroffen als lcSSc-Patienten. Centromer Antikörper scheinen sogar einen protektiven Effekt vor einer schweren Lungenfibrose zu haben.

Die pulmonal arterielle Hypertonie als primäre Form scheint häufiger bei Patienten mit lcSSc zu sein. Es kommt zur konsekutiven Erhöhung des Druckes im Lungenkreislauf mit Ausbildung eines Cor pulmonale als späte Komplikation. Die sekundäre Form als Folge der Lungenfibrose tritt ebenfalls als Spätkomplikation auf.[24-26]

Interessanterweise scheint auch das Krebsrisiko bei SSc Patienten deutlich erhöht zu sein. Am größten ist das Risiko an Lungenkrebs zu erkranken erhöht.[27, 28]

#### 1.2.3.3 Niere

Eine Nierenbeteiligung bei SSc ist in etwa 60-80 % der Patienten nachzuweisen. Milde Symptome, wie z.B. Hypertonie, leichtgradige Kreatininerhöhung und Mikroalbuminurie lassen sich bei etwa 50% der Patienten nachweisen. Eine Progression in akutes oder chronisches Nierenversagen ist zwar insgesamt deutlich seltener, aber eine gefürchtete Komplikation. In etwa 5-10 % der Patienten kommt es zur Ausbildung dieser renalen Krisen. Diese sind durch maligne Hypertonie, Anurie und progressives Nierenversagen charakterisiert. Eine starker Risikofaktor für das Auftreten von renalen Krisen ist das Vorhandensein von RNA-Polymerase III Antikörpern. Das relative Risiko

ist dabei > 3-fach erhöht. Mehr als

80 % der Patienten mit renalen Krisen leiden an einer dcSSc.[29-31]

#### 1.2.3.4 Herz, Muskulatur und Skelett

Primäre kardiovaskuläre Manifestationen der SSc beinhalten Herzrhythmusstörungen, Myokardfibrose, Perikardfibrose und Reizleitungsstörungen. Patienten mit symptomatischen Herzbeteiligungen haben die höchsten Mortalitätsraten unter den SSc-Patienten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass SSc ein unabhängiger Risikofaktor für das Auftreten von Herzinfarkten ist. Das Risiko war um 2,45 erhöht. Sekundär ergeben sich häufig aufgrund von arterieller Hypertonie und pulmonal arterieller Hypertonie Probleme.[32, 33]

Arthralgien und Myalgien gehören zu den frühesten Symptomen der SSc. Entzündliche Arthritiden werden allerdings selten beobachtet. Gelenkkontrakturen und Funktionseinschränkungen resultieren meistens aus der Hautverdickung. Allerdings zeigen Arthritiden und insbesondere palpable Reibungsveränderungen der Sehnen einen schwereren Krankheitsverlauf an.[34, 35]

#### 1.2.4 Therapie

Um die Therapie der Wahl zu definieren, muss zunächst mittels Diagnostik die Ausdehnung des Krankheitsbildes auf innere Organe und Haut festgestellt werden.

Üblicherweise wird die Therapieart je nach Organbefall ausgewählt. Egal welche der später genannten Substanzen benutzt wird ist der Effekt auf die Hautbeteiligung bestenfalls gering. Eine gute Therapie existiert bis dato nicht. Dies liegt einerseits an der bisher schlecht verstandenen Pathogenese sowie der Seltenheit der Erkrankung, die große Studien erschwert.[36]

Bei Patienten mit dcSSc, die bisher keine signifikanten Organbeteiligungen haben, wird eine systemische Therapie mit Methotrexat (MTX) oder Mycophenolatmofetil (MMF) empfohlen. Bezüglich MTX konnte in randomisierten kontrollierten Studien ein positiver Effekt auf den mRSS nachgewiesen werden.[37, 38]

Bei SSc-Patienten mit interstitieller Lungenbeteiligung zeigte sich durch Einsatz von Cyclophosphamid ein moderates, aber signifikantes Ansprechen der Erkrankung.[39]

Bei Fortschreiten der Lungenbeteiligung, die mittels Lungenfunktionsuntersuchung,

HR-CT und klinischer Untersuchung diagnostiziert wird, wird Cyclophosphamid meistens in monatlichen Abständen für 12 Monate in Kombination mit Glukokortikoiden eingesetzt.[40] Anschließend erfolgt häufig eine Erhaltungstherapie mit Mycofenolatmofetil (MMF).

Das ebenfalls häufige Auftreten einer pulmonal arteriellen Hypertonie wird genauso behandelt wie bei Patienten ohne SSc und sollte durch Zentren erfolgen.

Zuletzt konnte in einer Studie gezeigt werden, dass die Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen einen positiven Effekt auf das Ereignis-freie Überleben bei SSc-Patienten hat. Allerdings zeigte sich eine hohe therapieassoziierte Mortalität von ungefähr 10 %.[41]

In kleinen unkontrollierten Studien konnte außerdem ein moderates Ansprechen der Erkrankung auf den Einsatz von Rituximab gezeigt werden.[42]

Die Therapie des Raynaud-Syndroms unterscheidet sich nicht zwischen Patienten mit SSc und ohne. Das Therapieziel ist die Prävention von ischämisch bedingten Gewebsschäden. Eingesetzt werden dazu Calciumkanalblocker wie z.B. Nifedipin oder Amlodipin.[43] Bei therapieresistenten Verläufen kann die Therapie mit einem Phosphodiesterasehemmer wie z.B. Sildenafil ergänzt werden. Bei bestehenden Ulzerationen oder Nekrosen der Finger werden auch intravenöse Prostacyclinanaloga wie z.B. Iloprost oder ein Endothelin-1 Inhibitor (Bosentan) erfolgreich eingesetzt.[44]

Bei plötzlichem Auftreten eines arteriellen Hypertonus, Anstieg der Nierenretentionsparameter oder Proteinurie muss an eine Nierenbeteiligung im Sinne einer renalen Krise gedacht werden. Zur Therapie sollten dann Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) Hemmer eingesetzt werden. Einen präventiven Effekt von ACE Hemmern auf das Auftreten von renalen Krisen gibt es allerdings nicht.[45]

Der Einsatz von Glukokortikoiden sollte aufgrund häufigerer renaler Krisen möglichst vermieden werden.

Häufig auftretende Refluxbeschwerden aufgrund von Ösophagusmotilitätsstörungen werden symptomatisch mit Protonenpumpeninhibitoren behandelt. Außerdem können

Hypomotilitäten des GI-Traktes mit prokinetischen Medikamenten wie z.B. Metoclopramid oder Erythromycin behandelt werden.[46]

SSc Patienten mit Arthritiden sollten ähnlich zu Patienten mit rheumatoider Arthritis initial mit Glukokortikoiden und anschließend mit Basistherapeutika wie z.B. Hydroxychloroquin und Methotrexat behandelt werden.[47]

Direkte kardiale Manifestationen der SSc, also Perikarditis, Myokardfibrose, koronare Herzkrankheit und Herzrhythmusstörungen, werden identisch zu Patienten mit diesen Erkrankungen ohne SSc behandelt. Eine zielgerichtete Therapie der Myokarditis und Myokardfibrose bei SSc existiert nicht.

#### 1.2.5 Pathogenese

Die Pathogenese der SSc ist äußerst komplex und aktuell nur teilweise verstanden. Grundsätzlich spielen das Immunsystem, vaskuläre Veränderungen und die deutliche Vermehrung der Extrazellulärmatrix mit Verdickung der Haut eine entscheidende Rolle. Die meisten Hypothesen zur Pathogenese der Erkrankung gehen von einem initialen Zusammenspiel immunologischer und vaskulärer Ereignisse als Beginn der Erkrankung aus. Je nachdem, ob vaskuläre oder immunologische Faktoren stärker zum Tragen kommen, resultieren unterschiedliche Formen und Ausmaße der Fibrosierung. Dadurch ergibt sich ein sehr heterogenes klinisches Bild der Erkrankung. [48]

Im Folgenden soll durch Betrachtung der einzelnen Faktoren die Komplexität erläutert werden.

##### 1.2.5.1 Vaskuläre Veränderungen:

Vaskuläre Dysregulation begleitet die SSc ab der frühesten Phase. In den frühen Phasen der Erkrankung werden Endothelzellen aktiviert und führen durch die Expression von Adhäsionsmolekülen zur perivaskulären Infiltration von Entzündungszellen.[49, 50] Zu diesen Adhäsionsmolekülen gehören zum Beispiel E-selectin, ICAM-1 und VCAM-1, die alle in Endothelzellen von Sklerodermiepatienten vermehrt exprimiert werden. Über Bindungen an Integrine von T- und B-Zellen sowie Neutrophilen und Monozyten kommt es zur Migration dieser Zellen in den perivaskulären Raum.[51]

Außerdem scheint es zu einer vermehrten Ausschüttung von Endothelin zu kommen. Endothelin ist ein sehr potenter Vasokonstriktor und führt somit zur vaskulären Dysregulation. Ebenfalls wirkt Endothelin profibrotisch und könnte somit eine frühe Verbindung zwischen den vaskulären Veränderungen und der Fibrose darstellen.[52]

Entgegengesetzt zu Endothelin wirkt NO durch seinen vasodilatativen Effekt. Es wird kontrovers diskutiert, ob eine Verminderung der Freisetzung bei SSc-Patienten zur Pathogenese beiträgt. Die Datenlage dazu ist allerdings nicht eindeutig.[53]

Außerdem konnte gezeigt werden, dass es bei SSc Patienten zu einer defekten Gefäßneubildung kommt. Es scheint zu einer Störung der Endothelzellbildung zu kommen.[54]

Zusätzlich konnten in circa 30 Prozent der SSc-Patienten Antikörper gegen Endothelzellen nachgewiesen werden, die im Verdacht stehen, in diesen Zellen Apoptose zu induzieren.[55]

#### 1.2.5.2 Fibroblastenaktivität und Fibrose

Die übermäßige Aktivität der Fibroblasten mit Produktion von Extrazellulärmatrix wie Kollagen Typ I, III, IV, Proteoglykanen, Fibronectin, Fibrillin-1 und Glykosaminoglykanen kennzeichnet die SSc. Es konnte in verschiedensten in vivo und in vitro Experimenten gezeigt werden, dass die Produktion von Kollagen und anderen Bestandteilen der Extrazellulärmatrix durch die Fibroblasten deutlich erhöht ist. Aber nicht nur in der Haut, sondern auch in anderen Organen wie z.B. der Lunge konnte die abnormale Aktivität der Fibroblasten nachgewiesen werden.[56] Es konnte gezeigt werden, dass vor allem Fibroblasten in Nachbarschaft zu Blutgefäßen und perivaskulären entzündlichen Infiltraten besonders viel Kollagen produzieren.[57]

Ein potentieller Mechanismus für die Fibroblastenaktivierung und somit Beginn der Fibrose wird durch Wachstumsfaktoren und Zytokinen im perivaskulären Raum gesehen.

Eine besonders wichtige Rolle scheint dabei TGF- $\beta$  zu spielen, denn alle Zelltypen, die zum „SSc-Fibroblasten“ differenzieren, sind von diesem Zytokin und seinen Signalwegen abhängig.[58] Eine Deletion von TGF- $\beta$  in genetisch veränderten Mäusen führte auch wie erwartet zu einer Abschwächung der Fibrose.[59]

Allerdings kann dadurch alleine nicht das Verhalten der SSc-Fibroblasten erklärt werden. Es scheint, dass immunologische und andere Einflussfaktoren dazu führen, dass

sich ein autonomer Fibroblast entwickelt.

Bereits 1972 konnte *LeRoy et al.* zeigen, dass explantierte SSc-Fibroblasten ex vivo deutlich größere Mengen an Kollagen produzieren als Fibroblasten von gesunden Menschen. Gegenüber diesen gesunden Fibroblasten konnten Unterschiede in der Expression von TGF- $\beta$  Rezeptoren, Adhäsionsmolekülen und der Sekretion von Cytokinen und Chemokinen gefunden werden. [60]

Ebenfalls zeigte sich, dass die Fibrose nicht nur durch Aktivierung bereits im Gewebe sitzender Fibroblasten zu Stande kommt, sondern, dass auch die Differenzierung bzw. Transition von Endothelzellen, Epithelzellen und Adipozyten zu aktivierten mesenchymalen Zellen dazu beiträgt. Dazu kommt es durch Aktivierungen im TGF- $\beta$  Signalweg durch micro RNAs und andere Mediatoren. Man vermutet, dass Veränderungen bei diesen Mediatoren zum typischen Phänotyp des autonomen SSc-Fibroblasten führen.[58, 61] Ein Beispiel dafür wäre z.B. der „nuclear orphan“ Rezeptor PPAR- $\gamma$ , der eine wichtige Rolle in der Fibroblastenaktivierung spielt.[61]

Ein weiterer Faktor, der zur fortschreitenden Fibrose führt, ist die zunehmende Hypoxie des Gewebes. Eine Rarefizierung der Gefäße, v.a. durch die vaskuläre Dysregulation und exzessive Akkumulation von Extrazellulärmatrix, führen zur Gewebshypoxie. Diese dient als potenter Stimulus für die Synthese von Extrazellulärmatrix, v.a. Kollagen. Außerdem wird die Sekretion von TGF- $\beta$  stimuliert und epitheliale Zellen differenzieren sich zu Myofibroblasten.[62]

Zudem konnten Antikörper gegen MMP-1 und MMP-3 gefunden werden, die somit den Kollagenabbau durch Hemmung dieser Proteasen stören.[63]

#### 1.2.5.3 Beitrag der humoralen Immunantwort zur Pathogenese der SSc, Autoantikörper

Etwa 90-95% der SSc-Patienten haben Autoantikörper gegen eine oder mehrere typische Antigene. Wie bei anderen Kollagenosen auch, werden Antinukleäre Antikörper (ANA) gebildet, die sich gegen das Chromatin des Zellkerns richten.

Zu den Autoantikörpern gehören die Scl-70 Antikörper (anti-Topoisomerase-I Antikörper). Sie sind hochspezifisch für SSc (99%) und korrelieren mit einem höheren Risiko einer dcSSc und einer Lungenbeteiligung. Die Sensitivität ist allerdings gering (20-45%).[64]

Anti-Zentromer Antikörper (ACA) sind ebenfalls sehr spezifisch und treten bei der



lcSSc auf. Sie zeigen einen gutartigeren Verlauf der Erkrankung an und treten seltener in Kombination mit Lungenfibrose auf. Gehäuft findet man sie beim CREST Syndrom.[64]

RNA-Polymerase-3 Antikörper korrelieren besonders mit dem Auftreten von renalen Krisen und treten bei Patienten mit dcSSc in 4-20% der Fälle auf. Sie zeigen insgesamt einen schwereren Krankheitsverlauf an und gehen mit einer schlechten Prognose einher.[65]

Anti-Fibrillarin-Antikörper (U3-RNP-Ak) sind ebenfalls mit einer schlechten Prognose und vermehrter Herz- und Skelettbeteiligung sowie pulmonaler Hypertonie assoziiert.[66]

Noch seltener sind Anti-To/Th-AK mit 2-5%. Diese scheinen mit der limitierten Form der SSc zu korrelieren. Allerdings entwickeln Patienten mit diesen Antikörpern häufiger eine pulmonalarterielle Hypertonie. Die Prognose gegenüber Patienten mit ACA ist schlechter.[66]

Der Auslöser, der zur Bildung dieser Antikörper führt, ist aktuell nicht bekannt.

#### 1.2.5.4 Beitrag der T- und B-Zellen zur Pathogenese der SSc

Mittlerweile existieren viele Hinweise, dass auch T-Zellen bei der Pathogenese der SSc eine große Rolle spielen. Bereits 1984 konnte durch *Roumm et al.* gezeigt werden, dass nahezu alle infiltrierenden Zellen in Hautbiopsien bei Sklerodermiepatienten T-Zellen waren. [67]

Es konnten einige T-Zell Subpopulationen identifiziert werden, die zur Entzündung und Beschleunigung der Fibrosierung beitragen. Hauptsächlich handelt es sich dabei wohl um Th1 und Th-17 Zellen in den frühen Phasen der Erkrankung, wobei letztere v.a. durch die Produktion von proinflammatorischem IL-17 auffallen. In späteren Phasen der Erkrankung findet ein Shift in Richtung der Th2 Zellen statt. Diese Zellen produzieren hauptsächlich profibrotische Zytokine, wie z.B. IL-4, IL-13 und IL-5, die unter anderem für die fortschreitende Fibrose verantwortlich sind. [68, 69]

Es hat sich herauskristallisiert, dass gerade Th-17 Zellen eine wichtige Rolle in der Entstehung der SSc spielen könnten. In frühen Phasen der Erkrankung konnte eine vermehrte Produktion von IL-17 nachgewiesen werden. Ebenfalls zeigten sich höhere Werte an zirkulierenden Th-17 Zellen im Blut. Aktive Erkrankungen und schwerere Verläufe sind ebenfalls mit höheren IL-17 Werten behaftet, was eine Beteiligung dieses

Zytokins in der Pathogenese suggeriert.[70]

Unklar bleibt bislang der Einfluss von regulatorischen T-Zellen (Treg) in der Pathogenese. Es wurden Ergebnisse veröffentlicht, die suggerieren, dass eine Dysbalance zwischen den antiinflammatorischen Treg und den proinflammatorischen Th-17 Zellen zur Entwicklung der Erkrankung beitragen kann. Aufgrund von berichteten vermehrten[71], verminderten[72] und normalen[73] Zahlen an zirkulierenden Treg bei SSc Patienten bleibt die Datenlage sehr widersprüchlich. Trends deuten eher auf eine vermehrte, weniger funktionsfähige Treg-Population bei der SSc hin.[49]

Eine große Rolle scheinen ebenfalls die durch T-Zellen und Makrophagen ausgeschütteten Zytokine zu spielen. Dabei konnte gezeigt werden, dass IL-1, IL-4, IL-6, IL-17, CTGF (connective-tissue-growth-factor) und TGF- $\beta$  die Proliferation und Aktivierung von Fibroblasten begünstigen.[68]

Die B-Zell Homöostase ist bei Patienten mit SSc ebenfalls gestört. Es zeigte sich, dass es zu vermehrter Apoptose von Memory-B-Zellen kommt und dass somit naive B-Zellen in vermehrtem Maße durch das Knochenmark nachproduziert werden. Dysregulationen in B-Zell-Rezeptor Signalwegen und Hochregulation von aktivierenden Faktoren konnten in dieser Population nachgewiesen werden. Letztendlich führt das bei SSc Patienten zur vermehrten Autoantikörperproduktion und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, wie zum Beispiel IL-6.[74, 75]

### 1.3 Das Immunsystem

Es wird zwischen dem angeborenen unspezifischen und dem erworbenen spezifischen Immunsystem unterschieden. Das erworbene, spezifische Immunsystem, auch adaptive Immunität genannt, besteht aus humoraler und zellvermittelter Immunantwort.

#### 1.3.1 Die angeborene Immunität

Die angeborene Immunität bezieht sich auf die Immunantwort, die seit der Geburt vorhanden ist und im Laufe des Lebens durch Adaptation und Exposition gegenüber Mikroorganismen nicht erlernt wird. Die angeborene Immunität beinhaltet auf zellulärer Ebene Monozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Makrophagen, neutrophile und

basophile Granulozyten. Durch gemeinsame, konservierte Strukturen können diese Zellen pathogene Erreger erkennen und als schnelle Reaktion des Immunsystems diese phagozytieren und zerstören. Eine flexible Anpassung an Mikroorganismen wird zwar verhindert, aber eine schnelle Reaktion des Immunsystems wird ermöglicht. Daneben gehören auf humoraler Seite noch das Komplementsystem, Lysozym und diverse Interleukine zum angeborenen Immunsystem.[76]

### 1.3.2 Die adaptive Immunität

Die adaptive Immunität vermittelt eine späte, aber sehr effektive Antwort des Immunsystems. Eine Anpassung an den Erreger erfolgt und sie zeichnet sich durch eine hohe Spezifität gegenüber dem Erreger aus. Außerdem bildet sich im Laufe des Lebens ein Langzeitgedächtnis, welches bei erneutem Kontakt mit einem Pathogen zu einer schnellen Immunantwort befähigt.

Generell unterscheidet man die humorale und die zellvermittelte Immunität.

Die humorale Immunität wird über durch Plasmazellen gebildete Immunglobuline, die aus aktivierten B-Zellen entstehen, getragen. Allerdings sind auch T-Zellen, dendritische Zellen und andere antigenpräsentierende Zellen notwendig, damit B-Zellen spezifische Antikörper bilden. Bei jeder Immunantwort werden B-Gedächtniszellen gebildet, die bei erneutem Kontakt mit dem Antigen zu einer schnelleren Immunantwort führen.

Die zellvermittelte erworbene Immunität wird hauptsächlich durch T-Lymphozyten getragen. Jeder dieser T-Lymphozyten verfügt über einen T-Zell Rezeptor, der für jede Zelle spezifisch ist. Dieser T-Zell Rezeptor kann Bruchstücke von Antigenen erkennen, die auf anderen Zellen am sogenannten Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) gebunden sind. Man unterscheidet zwei Arten von T-Zellen: die CD4 + T-Zellen und die CD8 + T-Zellen. CD4 + T-Zellen binden an MHC Rezeptoren der Klasse II, während CD8 + T-Zellen an MHC Rezeptoren der Klasse I binden.

#### 1.3.2.1 CD8 + T-Zellen

Die CD8 + T-Zellen, die an MHC Rezeptoren der Klasse I binden, können zu zytotoxischen T-Zellen ausdifferenzieren nachdem sie von Antigen präsentierenden Zellen (APC) aktiviert wurden. Diese APC präsentieren ebenfalls auf MHC I

Rezeptoren Antigene, die von Pathogenen stammen, die sich intrazellulär replizieren. MHC Klasse I Rezeptoren sind auf allen Zellen des Körpers vorhanden und präsentieren Bruchstücke von intrazellulären Proteinen. Falls intrazelluläre Pathogene die Zelle infizieren, werden dessen Antigene über MHC I auf der Oberfläche präsentiert.

Die CD8 + zytotoxischen T-Zellen erkennen diese Antigene und töten infizierte Zellen somit ab.[77] Dieses funktioniert hauptsächlich über zwei Mechanismen: Exozytose von Granula und Expression des Fas Liganden. Die Granula der zytotoxischen T-Zellen enthalten eine Vielzahl von Substanzen (v.a. Granzyme), die in die Zielzelle gelangen und dort die Apoptose initiieren.

Der zweite Mechanismus beinhaltet die Expression des Fas Liganden auf der Oberfläche der zytotoxischen T-Zelle. Falls eine Zielzelle auf ihrer Oberfläche das Fas Molekül exprimiert, führt die Bindung mit dem Fas Liganden zu einer Apoptose der Zelle.

#### 1.3.2.2 CD 4 + T-Zellen

CD4 + T-Zellen befinden sich in ihrem naiven Zustand in sekundär lymphatischen Organen wie zum Beispiel den Lymphknoten und der Milz. Sie sind darauf angewiesen, dass dendritische Zellen migrieren und Informationen über neue immunologische Ereignisse aus der Peripherie bringen. Die naiven CD4+ T-Zellen scannen anschließend mit ihrem T-Zell Rezeptor die MHC II Moleküle der dendritischen Zellen. Durch die Erkennung eines passenden Antigens auf dem T-Zell Rezeptor der CD4 + T-Zelle und der Bindung von CD28 als Kostimulus wird eine intrazelluläre Kaskade in Gang gesetzt, die zur Aktivierung der T-Zellen führt.

Um naive T-Zellen von aktivierten oder Gedächtnis-T-Zellen zu unterscheiden, eignet sich das „leukocyte common antigen“ CD45. Verschiedene Isoformen dieses Moleküls werden in verschiedenen Phasen der Aktivierung von T-Zellen exprimiert: Naive T-Zellen exprimieren CD45-RA, während Gedächtnis-T-Zellen und aktivierte T-Zellen die Isoform CD45-RO exprimieren. Beide Zelltypen sind ebenfalls negativ für das andere Pendant.

Nach der Aktivierung migriert die aktivierte (Gedächtnis-/ Effektor-) CD4+ T-Zelle in peripheres Gewebe oder verbleibt im lymphatischen Gewebe, um weitere Interaktionen mit anderen Zellen (z.B. B-Zellen) durchzuführen.[78]

Aktiviert CD4+ T-Zellen werden hauptsächlich je nach deren Zytokinsekrektion in

unterschiedliche Kategorien eingeteilt. Während der Aktivierung ist entscheidend, welche Zytokine und welche Kostimulatoren vorhanden sind, um einen bestimmten Phänotyp zu entwickeln. Zum Beispiel treiben IL-12 und IFN- $\gamma$  die Entwicklung in Richtung der Th-1 Zellen, während IL-4 wichtig für die Entwicklung der Th-2 Zellen ist.[79]

Inzwischen wurden verschiedene Subgruppen dieser CD4+ T-Zellen identifiziert. Diese sollen im Folgenden näher betrachtet werden.

Zunächst teilte man die CD4+ T-Zellen in zwei Hauptkategorien ein. Zum einen die T-Helferzellen 1 (Th1) und die T-Helferzellen 2 (Th2). Diese beiden Gruppen unterscheiden sich anhand der produzierten Zytokine und in ihren darauf entstehenden Aufgaben im Immunsystem.

Th1 werden durch die Sekretion von IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10 und TNF- $\beta$  charakterisiert.[80] Außerdem kann man sie mittels der spezifischen Chemokinrezeptoren auf ihrer Oberfläche von anderen T-Helferzellgruppen unterscheiden. Th1 exprimieren CXCR3 und CCR5.[81]

Ihre Aufgaben sind zum Beispiel die Aktivierung von Makrophagen, die Hilfe bei der Eradikation von intrazellulären Erregern und die Förderung der Entwicklung von zytotoxischen T-Zellen.[82]

Th2 zeichnen sich vor allem durch die Sekretion von IL-4 aus. Außerdem werden IL-13, IL-5, IL-9, IL-10 und IL-25 sezerniert. Als spezifische Chemokinrezeptoren werden CCR3, CCR8 und CCR10 beschrieben. Eine große Rolle spielen Th2 in der Abwehr parasitärer Infektionen, denn sie sind unverzichtbar bei der Produktion von IgE und unterstützen die Entwicklung und Aktivität eosinophiler Granulozyten.[81, 82]

Vor nicht allzu langer Zeit wurden erstmals die T-Helferzellen 17 (Th17) beschrieben. Naive T-Zellen werden durch Stimulation mit IL-1 $\beta$  und IL-6 oder IL-23 in Richtung des Th17-Phänotyps getrieben. Der entscheidende Transkriptionsfaktor zur Th17-Differenzierung ist der retinoid-orphan-receptor- $\gamma$ t (ROR- $\gamma$ t). Das Leitzytokin von Th17 ist das proinflammatorische IL-17. Ansonsten produzieren sie IL-21, IL-22 und CCL-20. Mittels autokriner Stimulation durch IL-21 können Th17 ihre eigene Immunantwort deutlich amplifizieren. CCL-20 ist ein Ligand für CCR6, der ebenfalls auf Th17 exprimiert wird. Somit können an der Stelle der Entzündung weitere Th17 rekrutiert

werden.[83]

Ihre Aufgaben werden in der extrazellulären Abwehr von Bakterien und insbesondere Pilzen gesehen.[84] Durch IL-17-getriggerte Induktion von CXCL8, einem wichtigen Faktor bei der Rekrutierung von Neutrophilen in Epithel- und Endothelzellen, können Entzündungsreaktionen deutlich verstärkt werden. Außerdem können Th17 mittels Sekretion von IL-21 NK-Zellen, CD8+ T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen aktivieren.[83]

Letztendlich ergaben sich Hinweise, dass Th17 bei vielen Autoimmunerkrankungen, bei denen man von einer Th1 getriggerten Immunantwort ausging, eine tragende Rolle in der Entstehung spielen.[85]

Eine weitere wichtige Rolle spielen die regulatorischen T-Zellen (Treg), die in unserem Immunsystem zur Bewahrung einer Selbsttoleranz und Immunhomöostase unersetzlich sind. Bei Dysfunktionalität, z.B. aufgrund von Mutationen im Forkhead-Box-Protein P3 (FOXP3) Gen, kommt es zu tödlichen Autoimmunerkrankungen und Allergien. FOXP3 ist der wichtige Transkriptionsfaktor, der zur Differenzierung von Thymozyten zu Treg führt. IL-10 und TGF- $\beta$  sind Zytokine, die eine Differenzierung zu Treg ermöglichen. Aktivierte und Gedächtnis-Treg tragen auf ihrer Oberfläche CD25 (einen Teil des IL-2 Rezeptors) und zeichnen sich ebenfalls durch das Fehlen von CD127 aus. Über verschiedene Mechanismen können Treg in vivo andere T-Zellen supprimieren. Dazu gehören zum einen die Zytokin-vermittelten Suppressionsmechanismen: Über die Sekretion von TGF- $\beta$  kann in konventionellen T-Zellen FOXP3 induziert werden; über die Sekretion von IL-10 wird die Funktion der dendritischen Zellen vermindert; über Galectin-1 kann Apoptose in anderen T-Zellen induziert werden und durch Sekretion von CD25 kann IL-2, ein T-Zell Aktivator, abgefangen werden.

Zum anderen können Treg über kontaktvermittelte Mechanismen suppressive Funktionen ausüben: über die Bindung von CD95 mit CD95 Ligand (Fas Ligand) kann in T-Zellen die Apoptose induziert werden; über Exozytose bzw. Übertragung von Granzymen können T-Zellen lysiert werden; über CTLA4 können stimulatorische Funktionen von antigenpräsentierenden Zellen verringert werden.

Zuletzt hat sich allerdings auch gezeigt, dass es T-Zell Populationen mit Expression von FOXP3 gibt, die keine suppressiven Effekte ausüben. Sogar proinflammatorische

Fähigkeiten entstehen bei der in vitro Induktion von FOXP3 positiven T-Zellen. Die Definition von CD4+CD25+CD127-FOXP3+ T-Zellen als Treg scheint allerdings gut suppressive Treg abzubilden.[86]

### 1.3.3 Autoimmunität

Autoimmunität bezeichnet die Immunantwort gegen ein Antigen des eigenen Körpers. T- sowie B-Zellen sind normalerweise involviert. Es braucht eine Immunantwort des adaptiven Immunsystems gegen ein „Eigen-Antigen“.

Das Auftreten von Autoantikörpern ist normalerweise ein wichtiger Teil der Diagnostik von Autoimmunerkrankungen, obwohl die Antikörper meistens nicht das eigentliche auslösende Agens sind. Das bloße Vorhandensein von Autoantikörpern bedingt noch keine Erkrankung, da auch viele Gesunde Autoantikörper in sich tragen. Diese können unspezifisch im Rahmen von Infektionen oder anderen Erkrankungen auftreten. Allerdings kann das Auftreten von Autoantikörpern in manchen Fällen der Erkrankung um einige Zeit voraus sein, zum Beispiel beim systemischen Lupus erythematodes oder dem Diabetes mellitus Typ 1.[87, 88]

Eine Autoimmunität kann durch autologe oder fremde Antigene ausgelöst werden. Im Rahmen von Infektionserkrankungen kann es zum Beispiel zum sog. molekularen Mimikry kommen, bei dem fremde Antigene körpereigene Strukturen imitieren, sodass es auch zu einer Reaktion gegen das körpereigene Antigen kommt.

Wenn man von Autoimmunerkrankungen spricht und nicht von autoinflammatorischen Erkrankungen, dann sind autoreaktive CD4+ T-Zellen fast immer in der Pathogenese beteiligt. Normalerweise werden T-Zellen in ihrer Entwicklung im Thymus so selektioniert, dass keine selbstreagiblen Zellen entstehen.[89] Falls dort Fehler passieren, können Autoimmunerkrankungen durch Zusammenbruch der zentralen Toleranz entstehen. Normalerweise gibt es aber Kontrollmechanismen, die diese fehlerhaften T-Zellen in der Peripherie im Rahmen der peripheren Toleranzmechanismen abfangen und inaktivieren. Es gibt mittlerweile viele Theorien, die die Entstehung der Autoimmunität beschreiben. Einer davon wurde von *Nossal* beschrieben.[90]

Dabei geht man davon aus, dass T-Zellen Autoantigene erkennen, aber durch fehlende Kostimulation zunächst in einen Ruhestatus versetzt sind. Es besteht dann das Risiko, dass es durch einen anderen Reiz erst lange Zeit später zur Aktivierung dieser T-Zelle

und somit zur Selbstreagibilität gegen das Autoantigen kommt.

Wie oben schon erwähnt, spielt auch die Funktion der Treg eine Rolle in der Selbsttoleranz des Immunsystems. Diese Zellen können autoreaktive T-Zellen, die aus dem Thymus ausgebrochen sind, in ihrer Funktion supprimieren und somit unschädlich machen. Bei beeinträchtigter suppressiver Funktion der Treg können deshalb Autoimmunerkrankungen entstehen.[91, 92]

Ebenfalls spielen die vorhin erwähnten Th17 eine wichtige Rolle in einigen Autoimmunerkrankungen. Gerade die Balance von Treg und Th17 scheint wichtig zu sein. Ein zu großes Übergewicht auf der Seite der proinflammatorischen Th17 kann zu Autoimmunphänomenen führen.[93]

Die Aussortierung von autoreaktiven B-Zellen im Immunsystem existiert ebenfalls, ist aber weniger effektiv, da, wie schon vorher erwähnt, auch bei Gesunden häufiger Autoantikörper zu finden sind. Falls das passende Autoantigen zu den Autoantikörpern allerdings gut zugänglich ist, können Erkrankungen entstehen. Beispiele hierfür sind die Myasthenia gravis [94] oder der Morbus Basedow.[95]

Letztendlich ist die Heterogenität der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen sehr groß. Klar ist und bleibt allerdings, dass autoreaktive T-Zellen und B-Zellen eine entscheidende Rolle in der Entstehung spielen. Die Verteilung und das Zusammenwirken der verschiedenen entgegengesetzt wirkenden Mechanismen erklärt dann gegebenenfalls auch die große Verschiedenheit der klinischen Phänotypen.



#### 1.4 Fragestellung der Arbeit

Aufgrund der oben geschilderten sehr wahrscheinlichen Einflüsse von T-Zellen auf die Entstehung bzw. dem Fortschreiten der SSc sollte in dieser Arbeit eine Charakterisierung der CD4 und CD8 positiven T-Zellen und deren intrazellulärer Zytokinproduktion auf unspezifische Stimuli erfolgen.

- Es stellt sich die Frage, ob sich die untersuchten T-Zell Populationen bei Patienten gegenüber einem gesunden Kollektiv unterscheiden. Dieser Frage wurde mittels Untersuchung von T-Zell Aktivierungsmarkern und Analyse der T-Zell Phänotypen nachgegangen.
- Außerdem stellt sich die Frage, ob bestimmte proinflammatorische und profibrotische Zytokine in vermehrtem Maße von T-Zellen der SSc Patienten produziert werden und somit evtl. einen Beitrag zur Pathogenese leisten.

Es verdichten sich die Hinweise, dass ebenso wie bei anderen Autoimmunerkrankungen Th17 Zellen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der SSc spielen könnten.

- Es stellte sich deshalb die Frage, ob im peripheren Blut von SSc Patienten tatsächlich vermehrt Th17 zu finden sind und ob diese in vermehrtem Maße dazu fähig sind, proinflammatorische Zytokine zu produzieren.

Wenige und widersprüchliche Daten gibt es bisher zur Rolle der regulatorischen T-Zellen in der Pathogenese der SSc. Normalerweise sollten Treg durch immunsuppressive Effekte die Entstehung von Autoimmunerkrankungen verhindern. Es existieren Hinweise, dass eine beeinträchtigte Funktion der Treg zu Autoimmunerkrankungen führt.

- Hier stellte sich die Frage, ob Treg bei Patienten mit SSc in normalem Maße im Blut vorhanden sind und ob sie ihre suppressive Funktion regelhaft ausführen können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Die verwendeten Materialien sind in den Kapiteln 2.1.1 bis 2.1.9 zusammengefasst.

#### 2.1.1 Antikörper

##### 2.1.1.1 Oberflächenantikörper

CD3-FITC (Klon HIT3a)	BioLegend, San Diego, USA
CD3-BV421 (Klon UCHT1)	BioLegend, San Diego, USA
CD4-APC (Klon OKT4)	BioLegend, San Diego, USA
CD4-PE (Klon OKT4)	BioLegend, San Diego, USA
CD4-BV421 (Klon RPA-T4)	BioLegend, San Diego, USA
CD8-PerCP (Klon SK1)	BD Pharmingen, Heidelberg
CD8-PE (Klon SK1)	BioLegend, San Diego, USA
CD19-APC (Klon HIB19)	BioLegend, San Diego, USA
CD25-FITC (Klon M-A251)	BD Pharmingen, Heidelberg
CD28-PE-Cy7 (Klon CD28.2)	BioLegend, San Diego, USA
CD31-PE (Klon WM59)	BioLegend, San Diego, USA
CD45RO-PE (Klon UCHL-1)	BioLegend, San Diego, USA
CD45RO-PerCP-Cy5.5 (Klon UCHL1)	BioLegend, San Diego, USA
CD45RA-FITC (Klon HI100)	BioLegend, San Diego, USA
CD56-PE (Klon HCD56)	BioLegend, San Diego, USA
CD62L-PE (Klon DREG-56)	BioLegend, San Diego, USA
CD127-PE (Klon eBioRDR5)	eBiosciences, San Diego, USA
CD161-APC (Klon HP-3G10)	BioLegend, San Diego, USA
CCR5-APC-Cy7 (Klon 2D7/CCR5)	BD Pharmingen, Heidelberg
CCR6-PerCP-Cy5.5 (Klon 11A9)	BD Pharmingen, Heidelberg
CCR7-APC-Cy7 (Klon G043H7)	BioLegend, San Diego, USA
CXCR3-PerCP-Cy5.5 (Klon 1C6/CXCR3)	BD Pharmingen, Heidelberg
TCR- $\alpha/\beta$ -FITC (Klon T10B9.1A-31)	BD Pharmingen, Heidelberg
TCR- $\gamma/\delta$ -FITC (Klon 11F2)	BD Pharmingen, Heidelberg

#### 2.1.1.2 Intrazelluläre Antikörper

IFN- $\gamma$ -FITC (Klon 4S.B3)	BioLegend, San Diego, USA
TNF- $\alpha$ -FITC (Klon MAb11)	BioLegend, San Diego, USA
IL-13-PE (Klon JES10-5A2)	BioLegend, San Diego, USA
IL-9-PE (Klon MH9A3)	BD Pharmingen, Heidelberg
IL-6-PE (Klon MQ2-6A3)	BD Pharmingen, Heidelberg
IL-1 $\beta$ -PE (Klon AS10)	BD Pharmingen, Heidelberg
TGF- $\beta$ 1-PE (Klon TW4-6H10)	BioLegend, San Diego, USA
IL-4-APC (Klon 8D4-8)	BioLegend, San Diego, USA
IL-10-APC (Klon JES3-19F1)	BioLegend, San Diego, USA
IL-17-AF700 (Klon BL168)	BioLegend, San Diego, USA
FoxP3-PerCP-Cy5.5 (Klon 236a)	BD Pharmingen, Heidelberg
ROR $\gamma$ t-APC (Klon AFKJS-9)	eBiosciences, San Diego, USA

#### 2.1.2 Antibiotika

Penicillin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

#### 2.1.3 Stimulantien

anti-CD3-Antikörper (Klon OKT3)	BioLegend, San Diego, USA
anti-CD28-Anitkörper (Klon CD28.2)	BioLegend, San Diego, USA
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, München
Phytohämagglutinin (PHA)	Sigma-Aldrich, München
Ionomycin aus <i>Streptomyces conglobatus</i>	Sigma-Aldrich, München

#### 2.1.4 Chemikalien

Aqua dest.	
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Merck, Darmstadt
Bovine Serum Albumine (BSA)	Sigma-Aldrich, München
Brefeldin A aus <i>Penicillium brefeldianum</i>	Sigma-Aldrich, München
Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, München

FicoLite-H	Linaris, Drossenheim
Kaliumbicarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, München
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	selbst hergestellt
PBS-Tabletten	Thermo Fisher scientific, USA
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Serva, Heidelberg

### 2.1.5 Puffer und Lösungen

Phosphate Buffered Saline (PBS):

137mM NaCl  
2,7mM KCl  
10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

FACS Puffer (0,5% BSA, 0,01 % NaN<sub>3</sub>)

500 ml PBS  
2,5 g BSA  
2,5 ml NaN<sub>3</sub>(2%)

Einfriermedium (RPMI, 10 % DMSO, 20%FCS)

40 ml RPMI  
5 ml FCS  
5 ml DMSO

MACS Puffer (PBS, 0,5% BSA, 2mM EDTA)

500 ml PBS  
2,5 g BSA  
0,3722 g EDTA

Erythrozyten-Lyse Puffer

8,26 g NH<sub>4</sub>Cl  
1 g KHCO<sub>3</sub>  
0,037 g EDTA  
1000 ml Aqua dest.

Fixation Buffer

BioLegend, San Diego, USA

Permeabilization Buffer

BioLegend, San Diego, USA

### 2.1.6 Plastikwaren

Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
FACS Röhrchen	Greiner bio-one, Österreich
Falcon Röhrchen (10, 20, 50 ml)	Greiner bio-one, Österreich
Falcon Röhrchen mit Zellsieb	BD Pharmingen, Heidelberg
Kryoröhrchen	Sarstedt, Nürnberg
96-well U-Boden Platten	Greiner bio-one, Österreich
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
Zellkulturschalen	Greiner bio-one, Österreich

### 2.1.7 Geräte

Brutschrank	Heraeus, Hanau
Fluoreszenzzytometer FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg
Kühlschränke	Liebherr, Schweiz
VarioMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
QuadroMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MidiMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS LD-Column	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS MS-Column	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikroskop	Hund, Wetzlar
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Vortexer	Retsch, Haan
Waage Sartorius CP 124S	Sartorius, Göttingen
Wasserbad GFL	GFL, Burgwedel
Neubauer Zählkammer	
Zellkulturwerkbank Gelair BSB 6A	Flow Laboratories, Opera, Italien
Zentrifugen Rotanta K, Rotixa P	Hettich, Tuttlingen

### 2.1.8 Kits

Regulatory T Cell Isolation Kit II human                      Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Inhalt: CD4+CD25+CD127- T Cell Biotin Antibody Cocktail II, human

Anti-Biotin MicroBeads

CD25 MicroBeads II, human

### 2.1.9 Zellkulturmedien

Roswell Park Memorial Institute 1640(RPMI) 500 ml                      Sigma-Aldrich, München

Zusätze:                      50 ml FCS                      Merck Millipore, Darmstadt

L-Glutamin

5ml Penicillin/Streptomycin Lsg.                      Sigma-Aldrich, München

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Studienpopulation und Patientenmaterial:

Vollblut- und Serumproben wurden im Rahmen von Routineuntersuchungen nach Unterzeichnung der Einverständniserklärung von gesunden Probanden und Patienten mit SSc am Universitätsklinikum Würzburg im Zentrum für Innere Medizin und in der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie im Zeitraum von Oktober 2011 bis Juli 2012 gesammelt. Die Studie ist von der Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigt (Protokoll Nummer 242/11). Die Studie wurde entsprechend der Deklaration von Helsinki 2011 durchgeführt.

SSc Patienten wurden je nach Ausdehnung des Hautbefalls (siehe Tabelle 1) in zwei Gruppen eingeteilt: limitierte kutane Form (lSSc) und diffuse kutane Form (dSSc) der Erkrankung. Klinischen Daten der Patienten sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Insgesamt wurden 26 Patienten mit SSc rekrutiert, die nach den Klassifikationskriterien von LeRoy et al. [5] diagnostiziert wurden. Darunter befanden sich 17 Patienten mit einer limitiert kutanen Form und 9 Patienten mit einer diffus kutanen Form der Erkrankung. Es nahmen zusätzlich als Vergleichsgruppe 29 gesunde Erwachsene an der Studie teil. Ausschlusskriterien waren andere Autoimmunerkrankungen, Immundefekte, Infektionserkrankungen der letzten 6 Wochen und Zuführung von Blutprodukten (z.B. Transfusionen) in den letzten 3 Monaten.

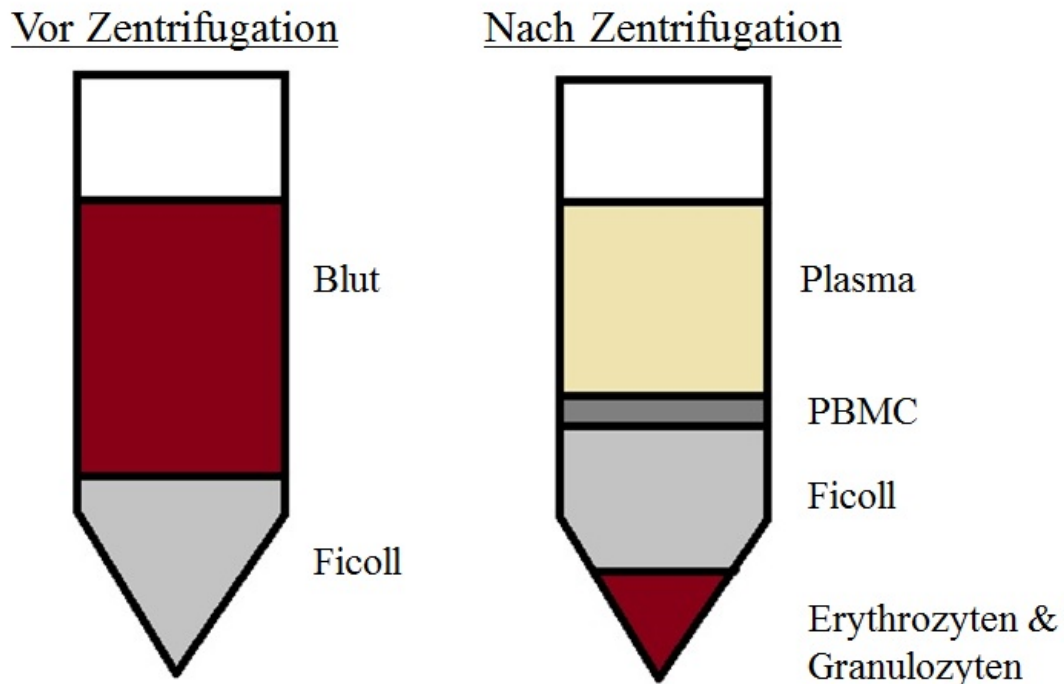
Von allen Studienteilnehmern wurden drei Röhrchen venöses EDTA Blut (jeweils 9 ml) und ein Serumröhrchen venöses Blut abgenommen.

### 2.2.2 Gewinnung und Lagerung von PBMCs mittels Ficoll Dichtegradientenzentrifugation

Zur Gewinnung der PBMCs aus dem venösen Vollblut der Patienten wurde eine Ficoll Dichtegradienten Zentrifugation angewendet. Dafür wurde in 50 ml Falcon Tubes zuerst 15 ml Ficoll (FicoLite-H, Linaris) pipettiert und anschließend das frische Blut, was zunächst noch mit 10 ml NaCl 0,9% gewaschen wurde, langsam auf das Ficoll geschichtet, sodass sich mit dem Blut eine zweite Phase bildete. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation mit einer Einstellung von 1490 relativer Zentrifugalkraft

(Zentrifuge: Hettich Rotixa S) für 25 min bei Raumtemperatur.

Durch die geringere Dichte der mononukleären Zellen des Blutes (PBMC) blieben diese in der Interphase zwischen Plasma und Ficoll. Erythrozyten und Granulozyten setzten sich aufgrund der höheren Dichte als Pellet ab (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1 Schematische Darstellung der Ficoll Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung der PBMC**

Anschließend wurden die PBMC vorsichtig abpipettiert und in einem neuen 50 ml Falcon Tube mit NaCl 0,9% aufgefüllt bzw. gewaschen. Evtl. mit abpipettiertes Ficoll wird somit verdünnt. Es erfolgte die erneute Zentrifugation bei 1700 rpm für 10 min. Der Überstand mit den restlichen Thrombozyten wurde verworfen und das Pellet mit den PBMC in 10 ml Erythrozyten-Lyse Puffer resuspendiert und darin 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um verbliebene Erythrozyten zu lysieren. Mittels Auffüllen des Falcon Tubes mit 37° warmem RPMI/10% FCS Nährmedium wird die Reaktion gestoppt. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 Minuten. Der Überstand wurde abgesaugt und das PBMC-Pellet erneut in 10 ml RPMI/10% FCS Nährmedium resuspendiert.

Um die Zellzahl zu bestimmen wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl einer



Trypanblaulösung vermischt. Danach folgte die Bestimmung der Zellkonzentration mit der Neubauer-Zählkammer (Mittelwert der 4 Quadranten \*  $10^4$  \* Verdünnungsfaktor 10 = Zellzahl/ml).

### 2.2.3 Einfrieren der PBMC

Die Zellsuspension mit den PBMC wurde erneut bei 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend in Einfriermedium resuspendiert, sodass pro ml Einfriermedium 4 Millionen PBMC gelöst waren. Die Suspension wurde in 1 ml Portionen in Cryoröhrchen pipettiert und in einem Behälter bei zunächst -80 °C eingefroren. Nach kurzer Lagerungszeit im -80°C Kühlschrank erfolgte der Transfer in flüssigen Stickstoff zur längerfristigen Lagerung der PBMC.

### 2.2.4 Auftauen der PBMC

Zum Auftauen wurden die Cryotubes mit den PBMC in ein 37°C warmes Wasserbad gehängt. Die PBMC Suspension wurde anschließend in ein 50 ml Falcon Tube pipettiert und dort mit RPMI/10% FCS Nährmedium aufgefüllt. Es folgte die Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 Minuten. Der Überstand mit dem Einfriermedium wird abgesaugt und die PBMC wurden zur weiteren Benutzung erneut in RPMI/10% FCS resuspendiert.

### 2.2.5 Färbung der PBMC zur Bestimmung des T-Zell Phänotyps und der intrazellulären Zytokine

Um den zellulären Phänotyp und die intrazellulär produzierten Zytokine der PBMCs zu bestimmen, wurden die PBMCs mit Antikörpern gegen folgende Oberflächenproteine, intrazelluläre Transkriptionsfaktoren und Zytokine angefärbt: CD3, CD4, CD8, CD19, CD56, CD45RO, CD45RA, CD62L, CD25, CD127, CCR6, CD161, CCR5, CD31, CD28, CXCR3, TCR $\alpha/\beta$ , TCR $\gamma/\delta$ , FOXP3, RoR $\gamma$ t, IL-4, IL-10, IL-9, IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17, TGF- $\beta$  und IL-13. Eine genaue Auflistung der verwendeten Antikörper ist in 2.1.1.1 aufgeführt. Das verwendete Färbeschema mit den gekoppelten Fluorochromen ist in Tabelle 3 dargestellt.

Es wurden pro Charakterisierung ca. 5 Millionen PBMCs aufgetaut. Etwa 4 Millionen dieser aufgetauten Portion wurden in 5 ml RPMI/10% FCS resuspendiert und in eine 5 ml Petrischale eingebracht. Es folgte die unspezifische Stimulation der PBMC mit 0,03  $\mu$ g/ml PMA und 1  $\mu$ g/ml Ionomycin. Dazu wurde zu den 5 ml 1,5  $\mu$ l einer Stocklösung

von PMA (100 µg/ml) und 5 µl einer Stocklösung von Ionomycin (1000 µg/ml) hinzugegeben. Damit später die Zytokine intrazellulär gemessen werden konnten, wurde ebenfalls zur Blockierung des Golgi-Apparates Brefeldin A in einer Konzentration von 10 µg/ml hinzugegeben. Dazu wurden 10µl einer Stocklösung mit 5000 µg/ml hinzugefügt. Die Petrischale mit den Zellen wurde anschließend für 4 Stunden bei 37°C im Inkubator inkubiert. Die restlichen etwa 1 Millionen PBMC blieben in RPMI/10% FCS gelöst und wurden unstimuliert im Brutschrank aufbewahrt.

Nach 4-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen aus der Petrischale auf die Tubes 1-13 aufgeteilt. Die unstimulierten PBMC auf die Tubes 14-17.

Anschließend wurde jedem Tube 1 ml FACS-Puffer dazugegeben und danach bei 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 50 µl FACS Puffer resuspendiert. Zu den 50 µl FACS Puffer wurden je 1 µl der Antikörper gegen die Oberflächenmarker hinzugefügt. Danach folgte eine 30 minütige Inkubation bei 4°C im abgedunkelten Kühlschrank. Nach den 30 Minuten wurde jedem Tube 1 ml PBS zum Waschen hinzugegeben. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 1500 rpm wurde der Überstand abgesaugt.

Anschließend wurden die Zellen für 20 Minuten zur Fixierung in 250µl Cytofix pro Tube bei 4°C inkubiert. Nach Ablauf der 20 Minuten wurde zum Waschen 1 ml Permeabilisierungspuffer hinzugefügt und erneut für 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 50 µl Permeabilisierungspuffer resuspendiert. Die Antikörper gegen intrazelluläre Zytokine und Transkriptionsfaktoren wurden anschließend in jeweils 1 µl Portionen hinzugegeben.

**Tabelle 3: Färbeschema der T-Zell Charakterisierung**

Röhr- chen	APC	APC- Cy7	PerCP	PerCP- Cy 5.5	PE	FITC	BV421	AF700	PE Cy7
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	CD4	CCR7	CD8		CD45RO	IFN- $\gamma$			CD28
3	CD4	CCR7	CD8		CD45RO	TNF- $\alpha$			CD28
4	CD4	CCR7	CD8		IL-13	CD45RA			CD28
5	CD4	CCR7	CD8		IL-9	CD45RA			CD28
6	CD4	CCR7	CD8		IL-6	CD45RA			CD28
7	CD4	CCR7	CD8		IL1 $\beta$	CD45RA			CD28
8	CD4	CCR7	CD8		TGF- $\beta$	CD45RA			CD28
9	IL-4	CCR7	CD8		CD4	CD45RA			CD28
10	IL-10	CCR7	CD8		CD4	CD45RA			CD28
11	CD161			CCR6	CD4	CD45RA		IL-17	CD28
12	IL-10			FoxP3	CD127	CD25	CD4	IL-17	
13	ROR- $\gamma$ t			CCR6	CD62L	CD45RA	CD4	IL-17	CD28
14	CD19		CD8		CD56	CD3	CD4		
15	CD4			CD45RO	CD31	TCR $\alpha/\beta$	CD3		
16	CD4			CD45RO	CD31	TCR $\gamma/\delta$	CD3		
17	CD4			CXCR3	CD8	CD45RA			

**Legende zu Tabelle 3:**

Verwendete Fluorochrome: Allophycocyanin (APC), Allophycocyanin-Cyanin 7 (APC- Cy7), Peridinin-Chlorophyll-Komplex (PerCp), Peridinin-Chlorophyll-Komplex Cyanin 5.5 (PerCp-Cy5.5), Phycoerythrin (PE), Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Brilliant Violet 421 (BV 421), Alexa Fluor 700 (AF700) und Phycoerythrin Cyanin 7 (PE-Cy7).

Die grau markierten Felder symbolisieren intrazelluläre Färbungen.

Nach erneuter 30-minütiger Inkubation bei 4°C erfolgte ein erneuter Waschschrift mit 1 ml Permeabilisierungspuffer und die anschließende Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 Minuten. Am Ende wurden die Zellen in 350  $\mu$ l FACS Puffer resuspendiert und standen bereit zur Messung am FACS Canto II.

### 2.2.6 FACS Analyse der angefärbten PBMCs

Alle verwendeten Antikörper waren an eines der folgenden Fluorochrome gekoppelt: FITC, APC, APC-Cy7, PE, PE-Cy7, PerCP, PerCP-Cy5.5, Brilliant Violet 421 und Alexa Fluor 700 (s.o.). Die angefärbten Zellen wurden je nach Anzahl der zu analysierenden Oberflächenmoleküle und intrazellulären Zytokine bzw. Proteine auf FACS Tubes aufgeteilt, sodass pro Ansatz mindestens 20.000 relevante Zellen gemessen werden konnten. Als Negativkontrolle diente jeweils eine ungefärbte Kontrolle der Zellen. Die Messung erfolgte mit einem FACS Canto II der Firma BD. Die Auswertung wurde mittels der FACSDiva Software Version 6 von BD vorgenommen.

### 2.2.7 Durchflusszytometrie und Einstellung des FACS Canto II

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Charakterisierung von Zellen anhand verschiedener Marker (z.B. Oberflächenmoleküle oder intrazelluläre Transkriptionsfaktoren). Diese Zellmarker werden ihrerseits mittels Bindung an fluoreszenzgekoppelte Antikörper angefärbt. Im Durchflusszytometer wird die Zellsuspension in Form eines laminaren Strahls durchgeschickt, sodass die Zellen nacheinander an einem Laserstrahl vorbeifließen. Durch diesen Laserstrahl können die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt werden, sodass sie wiederum selbst Lichtsignale in bestimmten Wellenlängen emittieren. Zunächst gibt es zwei grundlegende Detektoren in einem Durchflusszytometer: den FSC-Detektor (Forward Scatter, Vorwärtsstreulicht) und den SSC-Detektor (Side Scatter, Seitwärtsstreulicht). Das Vorwärtsstreulicht, also die Lichtstrahlen die in einem Winkel von  $180^\circ$  abgelenkt werden, ist ein Maß für die Beugung des Lichts und hängt somit vom Volumen oder der Größe einer Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht, also die Lichtstrahlen, die in einem Winkel von  $90^\circ$  abgelenkt werden sind ein Maß für die Brechung des Lichts und hängen somit mit der Granularität einer Zelle zusammen.

Je nach Art des Gerätes gibt es dann noch eine bestimmte Anzahl an weiteren Detektoren, die für die Registrierung der emittierten Lichtimpulse durch die Fluoreszenzfarbstoffe verantwortlich sind. Wenn Fluoreszenzfarbstoffe angeregt werden emittieren sie Lichtimpulse einer spezifischen Wellenlänge. Diese Lichtimpulse werden im Durchflusszytometer durch ein System von teildurchlässigen Spiegeln so abgelenkt, dass bestimmte Wellenlängen auf bestimmte Detektoren auftreffen. Je nach

Intensität des Lichtimpulses kann auf die Menge der gebundenen fluoreszenzgekoppelten Antikörper auf oder in der Zelle zurückgeschlossen werden.

Das in dieser Arbeit verwendete FACS Canto II verwendet 3 Laser und besitzt die Fähigkeit, 8 Kanäle (6 Fluoreszenzkanäle, FSC & SSC) gleichzeitig zu messen. Vor Beginn der Messreihen wurden mit Negativ- und Isotypkontrollen sowie Etablierungsversuchen die optimalen Einstellungen des Gerätes in Bezug auf Detektorenspannung und Kompensation der Detektoren zum Ausschalten überlappender Anteile in Fluoreszenzspektren auf andere Detektoren ermittelt.

#### 2.2.8 Carboxyfluorescein-succinimidylester (CFSE) Färbung

PBMCs wurden mit CFSE markiert, um die Proliferation zu messen. Das Prinzip hinter dieser Färbung ist, dass pro Zellteilung die Intensität des Fluoreszeins um etwa die Hälfte abnimmt, da sich die vorher an die Zellmembran gebundenen Fluoreszeinmoleküle auf zwei Zellen aufteilen und somit halbieren. Je geringer also die gemessene Fluoreszein Intensität ist, desto häufiger hat sich die jeweilige Zelle schon geteilt.

PBMC wurden dafür nach dem Auftauen zunächst bei 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend in 1 ml PBS/5% FCS resuspendiert. 1 ml einer 10 $\mu$ M Lösung von CFSE wurde anschließend addiert. Es folgte eine 5-minütige Inkubation der Zellen in der CFSE Lösung bei Raumtemperatur im Dunkeln. Exakt nach 5 Minuten wurde die Markierungsreaktion mit CFSE durch Zugabe von circa 40 ml RPMI/10% FCS gestoppt. Nach Zentrifugation (5 Minuten / 1500 rpm) und Entfernung des Überstandes wurden die Zellen erneut in Nährmedium resuspendiert und konnten weiterverwendet werden.

#### 2.2.9 Isolation von regulatorischen T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> T-Zellen)

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> T-Zellen (Treg) wurden aus vorher eingefrorenen PBMCs mit Hilfe des MACS Regulatory T Cell Isolation Kit II isoliert, basierend auf der Methodik einer Isolation mit magnetischen Perlen. Diese beruht darauf, dass bestimmte Oberflächenmarker mit Antikörpern, die an Biotin gekoppelt sind, markiert werden und anschließend durch Zugabe von magnetischen Perlen, die an Anti-Biotin-Antikörpern gebunden sind, magnetisiert werden. Die somit magnetisierten, markierten Zellen können in einer Säule mit Hilfe von Magnetismus gesammelt und somit selektioniert

werden.

20-30 Millionen PBMC wurden dafür aufgetaut und zur Vermeidung von Verklumpungen durch ein vorher mit sterilem Puffer getränktes Nylon Netz (30 µm) gesiebt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 10 Minuten bei 300g und die nachfolgende Resuspension in 40 µl MACS Puffer pro  $10^7$  Zellen. Pro  $10^7$  Zellen wurden danach 10 µl der fertigen „CD4+CD25+CD127- T-Cell Biotin-Antibody Cocktail II“ Lösung hinzugefügt. Diese enthält folgende Biotin-gekoppelte Antikörper: anti-CD8, anti-CD19, anti-CD123 und anti-CD127. Nach dem Vortexen folgte ein 10-minütiger Inkubationsschritt bei 4°C im Kühlschrank.

Anschließend wurden pro  $10^7$  Zellen 30 µl MACS-Puffer und 20 µl der Anti-Biotin MicroBeads hinzugefügt, die Suspension gevortext und danach für 15 Minuten im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Durch diesen Schritt erfolgte die Bindung der magnetischen Beads an die vorher markierten CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD123<sup>+</sup> und CD127<sup>+</sup> Zellen.

Nach Beendigung der Inkubationszeit mit den magnetischen Perlen wurden die Zellen mit 1 ml MACS Puffer gewaschen und für 10 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 500 µl MACS Puffer resuspendiert.

Eine LD-Säule wurde mit dem Durchlaufen von 2 ml MACS Puffer vorbereitet und in den QuadroMACS Magneten gehängt. Die Zellsuspension wird auf die Säule aufgetragen und der Durchlauf in einem Falcon Tube gesammelt. Um die Ausbeute zu erhöhen wird die Säule noch insgesamt zweimal mit 1 ml MACS Puffer gespült. Die somit selektionierten Zellen entsprechen einer CD4<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> T-Zell Population. Der Rest wird magnetisch in der LD-Säule gebunden und verworfen.

Die selektionierten Zellen werden anschließend für 10 Minuten bei 300 g zentrifugiert und das Pellet in 90 µl MACS Puffer pro  $10^7$  Zellen resuspendiert. Anschließend addierte man 10 µl CD25 Microbeads II pro  $10^7$  Zellen. Diese magnetischen Perlen sind direkt an CD25 Antikörper gekoppelt, sodass die Überbrückung mit Biotin wegfällt.

Nach dem Vortexen folgte eine 15 minütige Inkubation bei 4°C im Kühlschrank. Die Zellsuspension wurde anschließend erneut mit 1 ml MACS Puffer gewaschen, bei 300 g für 10 Minuten zentrifugiert und das Pellet in 500 µl MACS Puffer resuspendiert.

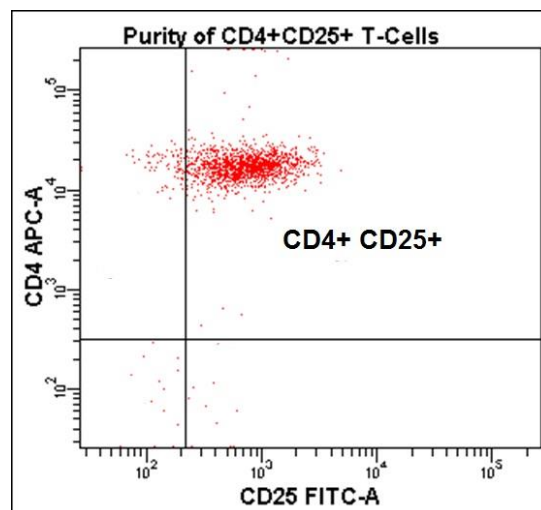
Die MS-Säule wird ebenfalls durch 500 µl MACS-Puffer Durchlauf vorbereitet und in den MiniMACS Magneten gehängt.

Die Zellsuspension wurde danach auf die MS-Säule aufgetragen und insgesamt mit dreimaligem Nachgeben von 500 µl MACS Puffer gespült.

Im Durchlauf sind nun die CD25<sup>-</sup> Zellen gesammelt. Die CD25<sup>+</sup> Zellen wurden aus der Säule ausgewaschen, indem man 500 µl MACS Puffer auf die Säule auftrug und mit einem Stopfen durchpresste. Somit wurden die zuvor magnetisch gebundenen CD25<sup>+</sup> Zellen eluiert.

Nach Zentrifugation der Zellsuspension und anschließender Resuspension wurden die somit gewonnenen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Zellen gezählt.

Ein kleiner Teil dieser Population wird nach o.g. Schema mit CD25-FITC, CD4-APC und CD127-PE gefärbt und mit dem Durchflusszytometer gemessen. Somit konnte die Reinheit der Zellsuspension bestimmt werden. Ein Beispiel der Färbung mit CD4-APC und CD25-FITC ist in Abbildung 2 abgebildet.



**Abbildung 2: Beispielhafter FACS Dotplot zur Darstellung der Reinheit der Isolation von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen. Die oben dargestellte Population entspricht einer 95% Reinheit.**

#### 2.2.10 Ansatz eines „Suppressionsassays“

Um die proliferative Kapazität der autologen PBMCs in Ko-Kultur mit den isolierten Tregs zu messen, wurden PBMC mit CFSE markiert (s.o.). Für den Suppressionsassay wurden die vorher isolierten Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> T-Zellen) und die CFSE-markierten PBMCs in einem Verhältnis von 1:1 in RPMI 1640 Medium, welches mit 1% Penicillin/Streptomycin und 7% FCS ergänzt wurde, in 96 well U-Boden Platten

pipettiert. Pro „well“ wurde eine Zellzahl von 30.000 Tregs und 30.000 PBMCs verwendet. Generell wurden Duplikate jeder Bedingung angefertigt.

Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen mit 0,5 µg/ml anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern für 5 Tage bei 37° C Temperatur. Nach dem Ernten der Zellen wurden die proliferierten Zellen mit CD4-APC sowie CD8-PE gefärbt und mittels Flow Cytometry analysiert. Der „Suppressionsindex“ wurde als Proliferation der PBMCs in Co-Kultur mit den Tregs, geteilt durch die Proliferation der PBMCs ohne Co-Kultur mit den Tregs definiert.

Insgesamt wurden die Proben von 7 SSc-Patienten und 6 gesunden Kontrollen mit dieser Methode gemessen.

#### 2.2.11 Messung der Serumzytokinspiegel

Die gesammelten Serumproben der Patienten und gesunden Kontrollen wurden zunächst zentrifugiert, der Serumüberstand anschließend abpipettiert und bei -80°C im Kühlschrank gelagert.

Zur Messung der Spiegel der Serumzytokine wurde das „FlowCytomix multiple analyte detection system for human Th1/Th2/Th9/Th18/Th22“ der Firma eBioscience verwendet.

Die methodische Durchführung wurde von Frau Kerstin Höfner (MTA Labor Prelog) streng nach Anleitung des Kits übernommen.

Die Serumproben wurden zunächst mit Antikörper-beschichteten Perlen gegen TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17 und IL-22 inkubiert. Anschließend wurden an Biotin gekoppelte Antikörper gegen die jeweiligen Zytokine zur Probe hinzugefügt und inkubiert. Nach dem Auswaschen der im Überstand befindlichen Biotin gekoppelten Antikörper erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt mit Streptavidin-Phycoerythrin. Dabei kam es zur Bindung des Streptavidins an Biotin gekoppelte Antikörper, die eine Zytokinbindung eingegangen waren. Anschließend wurde mittels Durchflusszytometrie mit dem FACS Canto II die Signalintensität des gebundenen PE gemessen und mittels Auswertung durch die „FlowCytomix Pro 2.4“ Software auf die Konzentrationen der Serumzytokine zurückgerechnet.



### 2.2.12 Statistik

Nach Testung der Variablen auf Normalverteilung mittels des Shapiro-Wilks-Test wurde der Mann-Whitney-U Test für nicht normalverteilte unabhängige Variablen angewendet. Beim verwendeten Statistikprogramm handelte es sich um Version 21 von SPSS für Windows (Chicago, IL).

Korrelationen wurden mittels Spearman's Rank Korrelation analysiert. Das „R“ zeigt den Spearman's rank Korrelationskoeffizienten an.

Auf der Suche nach unabhängigen Faktoren, die die Verteilung der T-Zellpopulationen und deren Zytokine beeinflussen, wurde eine stufenweise multiple Regressionsanalyse mit den Parametern Alter, Geschlecht, Erkrankungsdauer, Vorhandensein von Autoantikörpern, Organbeteiligung, BSG, CRP und Art der Therapie (MTX, Glukokortikoide, Azathioprin) durchgeführt.

P-Werte  $< 0,05$  wurden als signifikant gewertet.

Dargestellte Boxplots wurden ebenfalls mittels SPSS Version 21 hergestellt.

### 2.3 Definition der CD4/CD8+ T-Zell Subpopulationen in dieser Arbeit

Durch die technischen Fortschritte der Durchflusszytometrie ist es in den letzten Jahren möglich geworden auf Zellen 18 verschiedene Oberflächenmarker gleichzeitig zu detektieren und somit die Heterogenität der T-Zell Populationen darzustellen.

Daraus ergibt sich die theoretische Möglichkeit, die hier in dieser Arbeit behandelten CD4 und CD8 positiven naiven, Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen mit den modernen Durchflusszytometern bis ins kleinste Detail zu differenzieren und immer neue Populationen zu beschreiben. Eine eindeutige Nomenklatur dieser Subpopulationen existiert in der Literatur bisher nicht, was die Vergleichbarkeit von Studien weiterhin deutlich erschwert. Das hier verwendete Durchflusszytometer FACS Canto II ist in der Lage 8 Fluoreszenzen gleichzeitig zu messen.

Um diesem Problem zu begegnen, wurde durch *Mahnke et al. [96]* eine einheitliche Definition der CD4 und CD8 positiven T-Zellsubpopulationen vorgeschlagen. Diese berücksichtigt zur groben Differenzierung der Subpopulationen die Oberflächenmarker CD45RO bzw. CD45RA, CCR7, CD28 und CD95.

In dieser Arbeit reduzierten wir zur Definition der verschiedenen CD4 und CD8 pos. T-Zellsubpopulationen (ausgenommen der Th-17 und Treg) das Repertoire auf im Großen und Ganzen drei Oberflächenmarker: CD45RO bzw. CD45RA, CCR7 und CD28. Das soll im Folgenden begründet werden.

Historisch gesehen begann die Differenzierung der humanen T-Zellen durch die Entdeckung des Oberflächenmoleküls CD45RA, einer Splice-Variante des CD45 Gens, welches vor allem auf naiven T-Zellen exprimiert wird. CD45RO als niedermolekulare Splice-Variante dieses Gens zeigte sich vor allem auf Gedächtnis-T-Zellen exprimiert. Somit nahm man mit Hilfe dieses Unterscheidungsmerkmals die erste Unterteilung in naive CD45RA positive T-Zellen und CD45RO positive Gedächtnis-T-Zellen vor.

Es folgte anschließend unter anderem die Entdeckung von CCR7, einem Chemokinrezeptor, der für das „Homing“ der Zellen in lymphatisches Gewebe wie zum Beispiel Lymphknoten verantwortlich ist. In Studien zur Funktionalität von Gedächtnis-T-Zellen, die CCR7 exprimieren, wurde gezeigt, dass diese Population im Vergleich zu CCR7-negativen Gedächtnis-T-Zellen geringere Mengen an Effektorzytokinen

produziert.

Die CCR7-positiven Gedächtnis-T-Zellen wurden somit aufgrund ihrer Fähigkeit, in sekundär lymphatisches Gewebe zu migrieren, „zentrale Gedächtnis Zellen“ genannt. Ihr Gegenpart, die CCR7-negativen Gedächtnis-T-Zellen, wurden aufgrund ihrer Fähigkeit große Mengen an Effektorzytokinen zu produzieren, „Effektor Gedächtnis Zellen“ genannt.[97]

Weitere Untersuchungen bestätigten, dass die CCR7-positiven zentralen Gedächtnis-Zellen eine „jüngere“ Generation der Gedächtnis-T-Zellen darstellen und somit zur Differenzierung in Effektor Gedächtnis-T-Zellen fähig sind. Umgekehrt sind Effektor-Gedächtnis Zellen nicht fähig, ihre Differenzierung rückgängig zu machen.

CD28 verwendeten wir ebenfalls zur Unterscheidung der verschiedenen Subpopulationen, da mehrfach gezeigt wurde, dass CD28 im Laufe der T-Zell Reifung und Differenzierung auf der Zelloberfläche verloren geht.[98, 99] Somit eignet sich dieser Marker als Unterscheidungsmerkmal zwischen Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen.

Es zeigte sich, dass im peripheren Blut von Menschen größere Mengen von CCR7 negativen Gedächtnis-T-Zellen existieren, die allerdings noch CD28 exprimieren und somit offensichtlich noch nicht vollständig ausdifferenziert sind. Diese Population wurde von *Mahnke et al.*[96] „transitionale“ Gedächtnis-T-Zelle genannt.

*Lugli et al* [100] zeigten, dass nach Stimulation von Effektor-Gedächtnis-T-Zellen mit Interleukin 15, einem T-Zell-Aktivierungs- und –Proliferationsregulator, eine weitere terminal differenzierte Subpopulation entsteht, die erneut CD45RA exprimiert und somit oft TEMRA (terminal differenzierte Effektor-Gedächtnis-Zellen, die erneut CD45RA exprimieren) genannt wird. Diese Population trägt viele Marker für Immunoseneszenz und hat eine geringe proliferative Funktionalität, was die endgültige Differenzierung anzeigt.

In dieser Arbeit wurde somit aufgrund dieser Erkenntnisse die in Tabelle 4 aufgezeigte Nomenklatur und Differenzierung der CD4- und CD8- positiven T-Zellen gewählt:

**Tabelle 4 Differenzierung von T-Zell Subpopulationen**

	<b>Subpopulation</b>	<b>CD45RO</b>	<b>CD28</b>	<b>CCR7</b>
<b>Naive T-Zellen</b>	Naive T-Zellen	-	+	+
	CCR7 neg. naive T-Zellen	-	+	-
<b>Gedächtnis-T-Zellen</b>	Frühe, zentrale Gedächtnis-T-Zellen	+	+	+
	Späte, transitionale Gedächtnis-T-Zellen	+	+	-
<b>Effektor-T-Zellen</b>	Effektor-T-Zellen	+	-	-
	CCR7 pos. Effektor-T-Zellen	+	-	+
<b>Terminale Effektor-T-Zellen</b>	CCR7 pos. Terminale Effektor Zellen	-	-	+
	Terminal differenzierte Effektor-T-Zellen	-	-	-

Folgt man der Einteilung in der Tabelle von oben nach unten, so lässt sich eine zunehmende Differenzierung von naiver, hin zu terminaler, Effektor-T-Zellen nachvollziehen. Im Laufe ihrer Differenzierung und somit Ausreifung verlieren die Zellen ihr „homing“ Potential, ihre Proliferationsfähigkeit und ihre Fähigkeit, sich selbst zu erneuern. Allerdings gewinnen sie die Fähigkeit, in periphere Gewebe zu migrieren, Effektorfunktionen auszuführen und zeigen eine zunehmende Antigen-spezifität.[96]

Zusammengefasst definierten wir durch Färbung der Zellen mit an Fluorochromen gekoppelten Antikörper gegen CD4, CD45RA, CD45RO, CD28, CD31 und CCR7 (siehe Tabelle 4) folgende T-Zell Subpopulationen:

**Naive T-Zellen** wurden als CD45RA<sup>+</sup> oder CD45RO<sup>-</sup>, CD28<sup>+</sup> und CCR7<sup>+</sup> T-Zellen beschrieben. Eine für CCR7 negative naive T-Zellpopulation, die jedoch kein CD45RO, aber CD28 exprimiert, wurde als CCR7<sup>-</sup> naive T-Zellpopulation beschrieben.

CD31<sup>+</sup>, TCRα/β<sup>+</sup> / TCRγ/δ<sup>-</sup> T-Zellen wurden als naive T-Zellen (RTE = recent thymic emigrants) beschrieben, nachdem CD31 unter anderem als Marker für naive T-Zellen mit frischer Emigration aus dem Thymus beschrieben wurde.[101]

**Gedächtnis-T-Zellen** wurden durch Vorhandensein von CD45RO und CD28 definiert. Bei zusätzlicher Expression von CCR7 wurde die Population als frühe, zentrale Gedächtnis-T-Zellen definiert(CD45RO+CD28+CCR7+).

CD45RO+ CD28+ CCR7- T-Zellen wurden als späte, transitionale Gedächtnis-T-Zellen definiert.

**Effektor-T-Zellen** wurden durch Vorhandensein von CD45RO und Abwesenheit von CD28 beschrieben. Bei Expression von CCR7 wurde die Subpopulation (CD45RO+CD28-CCR7+) CCR7 positive Effektor-T-Zellen genannt.

**Terminale Effektor-T-Zellen** wurden als CD45RO- CD28- CCR7- definiert. Die Nomenklatur als TEMRA (terminal differenzierte Gedächtnis-T-Zellen, die erneut CD45RA exprimieren) wurde nicht gewählt, da zur Färbung CD45RO verwendet wurde.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Patientenkollektiv**

Insgesamt wurden 26 Patienten mit SSc, darunter 17 mit lcSSc und 9 mit dcSSc rekrutiert (siehe Tabelle 5). Dem gegenüber befand sich eine Population von 29 gesunden Kontrollen. Von den Patienten mit SSc waren 80,7% weiblich und 19,3 % männlich. Bei den gesunden Kontrollen waren 75,7% weiblich und 24,1% männlich. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Geschlechtsverteilung dieser Gruppen.

Das mittlere Alter der SSc-Patienten betrug 59 Jahre; das der gesunden Kontrollen 54 Jahre. Signifikante Unterschiede in der Altersverteilung ergaben sich allerdings nicht.

Die mittlere Krankheitsdauer der SSc Patienten betrug 12 Jahre. LcSSc Patienten hatten eine mittlere Erkrankungsdauer von 15 Jahren, während Patienten mit dcSSc im Mittel 8 Jahre erkrankt waren. Es zeigte sich keine Korrelation zwischen Erkrankungsdauer und Alter der Patienten. ( $R=0,224$ ,  $p=0,282$ ).

Bezüglich der Organbeteiligung der Erkrankung ergaben sich zwischen dcSSc und lcSSc in Bezug auf die Anzahl der Patienten keine signifikanten Unterschiede. Von allen SSc Patienten litten 61,5% an einer Organbeteiligung der Erkrankung.

Signifikant mehr Patienten mit dcSSc trugen Scl-70 Antikörper im Vergleich zu lcSSc Patienten. Anti-Zentromer Antikörper waren signifikant häufiger in Patienten mit lcSSc zu finden.

Insgesamt 57,7% der SSc-Patienten nahmen mindestens eine Medikation ein. Prozentual gesehen stehen mehr dcSSc-Patienten unter Medikation, als lcSSc-Patienten (88,9% vs. 41,2%). Ein signifikanter Unterschied ergab sich allerdings nicht.

Bezüglich der BSG und des CRP Wertes ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den Patientengruppen lcSSc und dcSSc. Allerdings korrelierten BSG und CRP bezogen auf alle SSc-Patienten erwartungsgemäß miteinander ( $R=0,765$ ,  $p=0,016$ ).

Bezüglich der Leukozytenzahlen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den SSc-Patienten und den gesunden Kontrollen. Es zeigte sich jedoch eine signifikante relative Lymphopenie der SSc-Patienten gegenüber HC ( $p=0,001$ ). Die relative Lymphopenie der dcSSc-Patienten erwies sich gegenüber den lcSSc Patienten ebenfalls als signifikant ( $p=0,041$ ).

**Tabelle 5 Patientenkollektiv und Gesunde Kontrollen**

	Systemische Sklerose (SSc)	limitiert kutane (lcSSc)	diffus kutane (dcSSc)	p-Wert <sup>a</sup>	Gesunde Kontrollen (HC)	p-Wert <sup>b</sup>	p-Wert <sup>c</sup>
<b>Anzahl</b>	26	17	9	---	29	---	---
<b>Weiblich/männlich (Anzahl/Prozentzahl)</b>	21 (80,7%) /5 (19,2%)	15 (88,2%) /2 (11,8%)	6 (66,7%) /3 (33,3%)	0,544	22 (75,7%) /7 (24,1%)	0,744	
<b>Alter (Jahre)</b>	59±10 (55; 42 – 77)	60±12 (56; 42 - 77)	57±6 (55; 48 - 71)	0,751	54±6 (55; 37 - 61)	0,182	
<b>Krankheitsdauer (Jahre)<sup>a</sup></b>	12±11 (10; 1 - 42)	15±12 (12; 1 - 42)	8±8 (4; 1 -24)	0,108	---	---	---
<b>Organbeteiligung</b>	16/61,5%	9/52,9%	7/77,8%	0,210	---	---	---
<b>Scl-70 (Topoisomerase-1 Antikörper)</b>	11/42,3%	5 / 29,4%	6 /66,6%	0,001	Nicht analysiert	---	---
<b>Anti-Zentromer (CENB Antikörper)</b>	7/26,9%	6 / 35,3 %	1 / 11,1%	0,001	Nicht analysiert	---	---
<b>Medikation (Anzahl/Prozentzahl)<sup>d</sup></b>	15/57,7%	7/41,2%	8/88,9%	0,013	0/ 0%	---	---
<b>Methotrexat</b>	5/19,2%	2 / 11,8%	3 / 33,3%	0,027	0/ 0%	---	---
<b>Azathioprin</b>	7/26,9%	4 / 23,5%	3 / 33,3%	0,004	0/ 0%	---	---
<b>Glucokorticoide</b>	6/23,1%	2 / 11,8%	4 / 44,4%	0,001	0/ 0%	---	---
<b>Cyclophosphamid</b>	1/3,8%	0 / 0%	1 / 11,1%	0,118	0/ 0%	---	---
<b>BSG (mm/1h)</b>	28±21 (23; 5 – 79)	27,8±20,1 (19,5; 7 – 65)	30±24 (25; 5 – 79)	0,846	Nicht analysiert	---	---
<b>CRP (mg/dl)</b>	0,5±0,9 (0,16; 0,02 – 3,31)	0,3±0,7 (0,14; 0,02 – 2,97)	0,7±1,1 (0,26; 0,08 – 3,31)	0,312	Nicht analysiert	---	---
<b>Leukozyten (*1000/µl)</b>	6,8±1,9 (6,4; 3,7 – 10,8)	6,5±1,6 (7,7; 4,3 – 10,8)	7,2±2,4 (6,2; 3,7 – 9,2)	0,597	6,6±2,9 (6,2; 3,6 – 11,1)	0,718	0,718
<b>Lymphozyten (% der Leukozyten)</b>	19,1±8,2 (21,0; 3,2 – 30,7)	22,1±5,8 (22,6; 10,3 – 30,7)	14,1±9,4 (11,3; 3,2 – 28,7)	0,041	28,7±7,8 (27,5; 18,8 – 47,1)	0,001	0,002

**Legende zu Tabelle 5:**

Werte sind in Mittelwert ± Standardabweichung angegeben (Median; Standardabweichung).

<sup>a</sup>Vergleich zwischen lcSSc und dcSSc. <sup>b</sup>Vergleich zwischen SSc und HC. <sup>c</sup>Vergleich zwischen dcSSc und HC.

<sup>d</sup>Medikamente: Methotrexat (Dosierung 10-15 mg/m<sup>2</sup> pro Woche, maximal 25 mg/m<sup>2</sup> pro Woche); Azathioprin (Dosierung 1-3 mg/kg/Tag); Glucokortikoide (Prednisolon Äquivalenzdosis <0.5 mg/kg/Tag mit einem Maximum von 60 mg/Tag); Cyclophosphamid (Dosierung: Bolus von 800 mg/m<sup>2</sup>). Abkürzungen: C-reaktives Protein, CRP; Blutsenkungsgeschwindigkeit: BSG. Organbeteiligung: Erhöhte organspezifische Laborparameter von Niere, Leber, Gallenwegen, Herz und/oder sonografischen Pathologien und/oder nachgewiesene Ösophagusmotilitätsstörung.

### 3.2 Vergleich von CD4+ und CD8+T-Zellen, B-, NK- und NK-T-Zellen

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der CD4+ T-Zellen in den Lymphozyten: Patienten mit dcSSc hatten signifikant kleinere Proportionen an CD4+-T-Zellen als Patienten mit lcSSc ( $p=0,021$ ) (siehe Tabelle 6). Die Proportionen der CD8+-T-Zellen schienen in dcSSc Patienten größer zu sein, als in lcSSc Patienten. Allerdings ergab sich hier kein signifikanter Unterschied ( $p=0,066$ ). Die Gesamtheit der SSc-Patienten zeigte gegenüber den gesunden Kontrollen bezüglich Verteilung der CD4+T-Zellen ( $p=0,345$ ), CD8+ T-Zellen ( $p=0,742$ ), B-Zellen ( $p=0,655$ ) und NK-Zellen ( $p=0,084$ ) keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 6). Es zeigten sich jedoch signifikant geringere Proportionen von CD3+CD56+ NK-T-Zellen in den SSc-Patienten als in den gesunden Kontrollen ( $p=0,012$ ). Außerdem konnte eine signifikante relative B-Zell Verminderung in Patienten mit dcSSc im Vergleich zu lcSSc-Patienten und HC ( $p=0,021$ ;  $p=0,029$ ) nachgewiesen werden.

**Tabelle 6 Prozentuale Verteilung der übergeordneten CD4+-, CD8+-T-Zellen, B-, NK- und NK-T-Zellen auf die Gesamtzahl der Lymphozyten in SSc-, dcSSc-, lcSSc-Patienten und gesunden Kontrollen.**

	Systemische Sklerose (SSc)	limitiert kutane (lcSSc)	diffus kutane (dcSSc)	p-Wert <sup>a</sup>	Gesunde Kontrollen (HC)	p-Wert <sup>b</sup>	p-Wert <sup>c</sup>
<b>CD4+ T-Zellen</b>	57,1±13,5 (58,1; 15,2 – 79,2)	60,9±11,0 (61,9; 30,1 – 79,2)	50,0±15,4 (51,2; 15,2 – 72,2)	0,021	55,9±8,2 (57,8; 42,5 – 75,8)	0,345	0,248
<b>CD8+ T-Zellen</b>	17,5±10,0 (15,4; 3,5 – 40,0)	14,6±7,7 (12,6; 4,1 – 37,0)	22,9±12,1 (19,4; 3,5 – 40,0)	0,066	16,6±6,4 (16,0; 7,4 – 27,3)	0,742	0,115
<b>CD19+ B-Zellen</b>	14,5±10,7 (13,1; 0,5 – 41,2)	17,9±10,5 (15,5; 4,0 – 41,2)	8,0±8,3 (3,9; 0,5 – 20,9)	0,021	14,5±6,4 (12,8; 5,1 – 29,8)	0,655	0,029
<b>CD56+ NK-Zellen</b>	13,3±17,2 (5,1; 0,4 – 56,1)	12,4±15,5 (6,2; 0,4 – 50,1)	15,1±21,0 (2,3; 0,4 – 56,1)	0,525	12,4±8,1 (8,7; 2,3 – 30,3)	0,084	0,234
<b>CD3+CD56+ NK-T-Zellen</b>	1,8±2,9 (0,9; 0,1 – 14,0)	1,2±0,9 (0,9; 0,2 – 3,2)	3,0±4,7 (1,2; 0,1 – 14,0)	0,916	2,5±2,0 (1,9; 0,3 – 7,7)	0,012	0,208

**Legende zu Tabelle 6:**

Relative Werte in Bezug auf Lymphozyten. Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben (Median; Minimum - Maximum).

<sup>a</sup>Vergleich zwischen lcSSc und dcSSc. <sup>b</sup>Vergleich zwischen SSc und HC. <sup>c</sup>Vergleich zwischen dcSSc und HC.

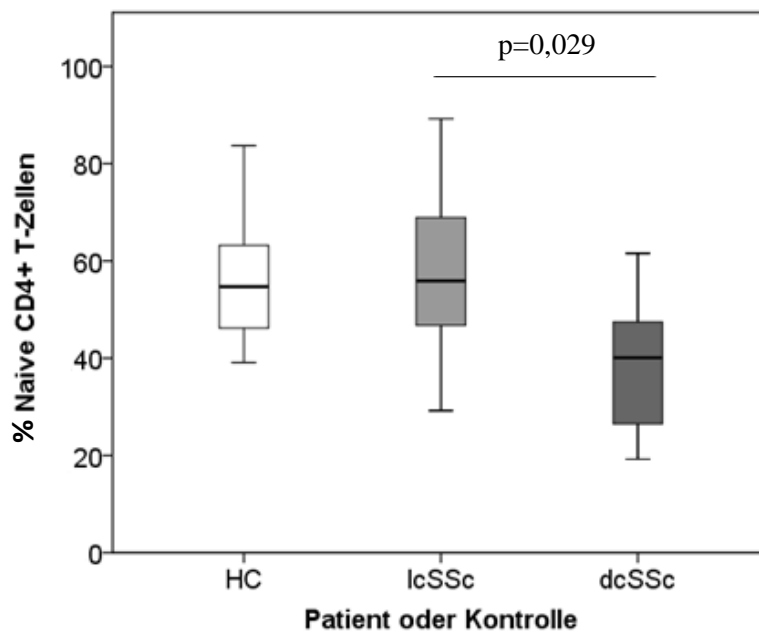


### 3.3 CD4+ T-Zellen

#### 3.3.1 Verteilung der Naiven-/Memory-/Effektor-/TEMRA-in CD4+ T-Zellen

##### 3.3.1.1 Naive CD4+ T-Zellen

Betrachtet man die naiven CD4+ T-Zellen, zeigte sich, dass Patienten mit dcSSc signifikant kleinere Proportionen dieser Population gegenüber lcSSc-Patienten ( $p=0,029$ ) und gesunden Kontrollen ( $p=0,022$ ) haben. Die Gesamtheit der SSc Patienten und damit auch die Patienten mit lcSSc unterschieden sich hinsichtlich dieser Population nicht von den gesunden Kontrollen (siehe Tabelle 8, Abbildung 3).



#### **Abbildung 3 Naive CD4+ T-Zellen**

Es zeigen sich signifikant geringere Proportionen der naiven CD4+ T-Zellen bei Patienten mit dcSSc. Auf der Y-Achse sind die Prozentwerte der naiven T-Zellen als Anteil der CD4+ T-Zellen angegeben. Auf der X-Achse sind die gesunden Kontrollen (HC), Patienten mit limitiert kutaner SSc (lcSSc) und Patienten mit diffus kutaner SSc (dcSSc) aufgeführt.

Betrachtet man die CCR7 negativen naiven T-Zellen, ergab sich zwischen dcSSc und lcSSc Patienten ein Trend zu kleineren Proportionen dieser Population bei dcSSc-Patienten ( $p=0,080$ ). Zwischen den dcSSc-Patienten und gesunden Kontrollen zeigte sich allerdings kein signifikanter Unterschied ( $p=0,159$ ).

CD31+TCR $\alpha/\beta$ + T-Zellen zeigten sich in geringeren Proportionen bei dcSSc-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen ( $p=0,035$ ). CD31 ist ein Marker, den unter anderem T-Zellen tragen, die frisch aus dem Thymus emigriert sind.[102]

Vergleicht man SSc-Patienten mit Organbeteiligung mit Patienten ohne Organbeteiligung zeigte sich, dass naive T-Zellen bei Patienten mit Organbeteiligung in deutlich kleineren Proportionen zu finden waren. Eine Signifikanz ergab sich allerdings knapp nicht ( $p=0,060$ ) (Tabelle 7).

**Tabelle 7 Prozentuale Verteilung von CD4+ T-Zell Subpopulation auf die Gesamtzahl der CD4+ T-Zellen bei SSc-Patienten mit und ohne Organbeteiligung.**

	<b>SSc-Patienten mit Organbeteiligung</b>	<b>SSc-Patienten ohne Organbeteiligung</b>	<b>p-Wert<sup>a</sup></b>
<b>Naive T-Zellen (CD45RO-CD28+CCR7+)</b>	45,5 $\pm$ 18,8 (47,3; 19,3 – 89,2)	61,7 $\pm$ 16,1 (68,2; 40,1 – 87,4)	0,060
<b>Späte, transitionale Gedächtnis-T-Zellen (CD45RO+CD28+CCR7-)</b>	22,2 $\pm$ 9,5 (25,1; 2,9 – 37,3)	15,5 $\pm$ 8,0 (12,2; 4,0 – 28,5)	0,135
<b>Effektor-T-Zellen (CD45RO+CD28-CCR7-)</b>	1,6 $\pm$ 1,3 (1,2; 0,1 – 4,3)	0,5 $\pm$ 0,04 (0,4; 0,0 – 0,13)	0,012

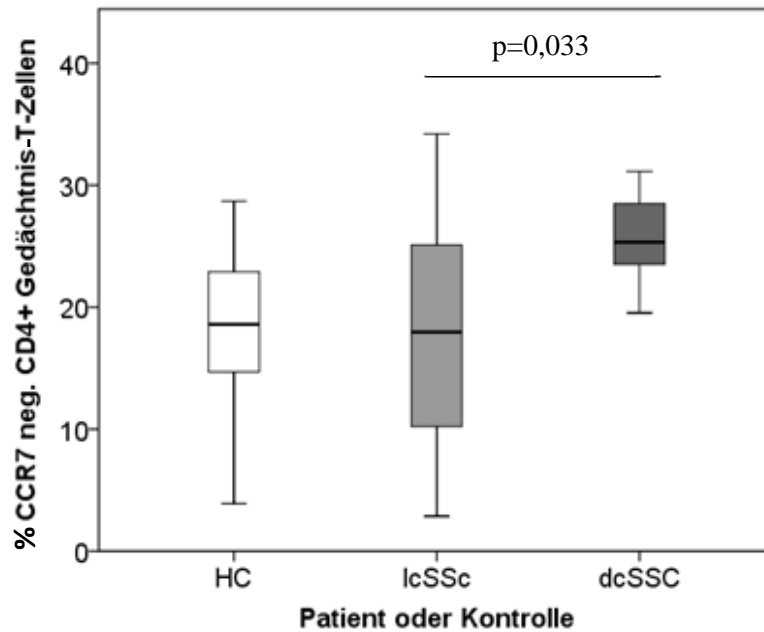
**Legende zu Tabelle 7:**

Relative Prozentwerte in Bezug zu CD4+T-Zellen. Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben (Median; Minimum - Maximum).

<sup>a</sup>Vergleich zwischen SSc-Patienten mit Organbeteiligung und ohne Organbeteiligung.

### 3.3.1.2 CD4+ Gedächtnis-T-Zellen

Es zeigte sich, dass größere Proportionen der CCR7 negativen CD4+ späten, transitionalen Gedächtnis-T-Zell-Population bei Patienten mit dcSSc im Vergleich zu lcSSc-Patienten ( $p=0,033$ ) und gesunden Kontrollen ( $p=0,010$ ) vorkommen (siehe Tabelle 8, Abbildung 4).



**Abbildung 4 CCR7 neg. CD4+ späte, transitionale Gedächtnis-T-Zellen**

Es zeigen sich signifikant größere Proportionen der CCR7 neg. CD4+ Gedächtnis-T-Zellen bei Patienten mit dcSSc im Vergleich zu lcSSc-Patienten ( $p=0,033$ ).

Auf der Y-Achse sind die Prozentwerte der CCR7- CD4+ Gedächtnis-T-Zellen als Anteil der CD4+ T-Zellen angegeben. Auf der X-Achse sind die Gruppen mit gesunden Kontrollen (HC), Patienten mit limitiert kutaner SSc (lcSSc) und Patienten mit diffus kutaner SSc (dcSSc) aufgeführt.

Bezüglich der Proportionen von frühen, zentralen CD4+ Gedächtnis-T-Zellen (CD45RO+CD28+CCR7+) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen SSc Patienten und gesunden Kontrollen, sowie zwischen den dcSSc- und lcSSc-Patienten (Tabelle 8).

**3.3.1.3 CD4+ Effektor T-Zellen**

Klassische Effektor-T-Zellen (CD45RO+CD28-CCR7-) waren in signifikant kleineren Proportionen bei dcSSc-Patienten zu finden, als bei lcSSc-Patienten ( $p=0,029$ ). Gegenüber gesunden Kontrollen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,153$ ).

Signifikant größere Proportionen von CCR7+ CD4+ Effektor-T-Zellen (CD45RO+CD28-CCR7+) fanden sich bei dcSSc Patienten im Vergleich zu lcSSc-Patienten ( $p=0,027$ ) und zu gesunden Kontrollen ( $p=0,027$ ) (siehe Tabelle 8).

Ein neu definierter CCR7 positiver terminaler Effektor-T-Zell-Typ (CD45RO-CD28-CCR7+) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen.

Die CD4+ terminal differenzierten Effektor-T-Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede in den Proportionen der CD4+ T-Zellen zwischen lcSSc-, dcSSc-Patienten und gesunden Kontrollen (Tabelle 8).

**Tabelle 8 Proportionale Verteilung von CD4+ T-Zell Subpopulationen in SSc-, dcSSc-, lcSSc-Patienten und Gesunden Kontrollen.**

Gruppe	Systemische Sklerose (SSc)	diffus kutane Systemische Sklerose (dcSSc)	limitiert kutane Systemische Sklerose (lcSSc)	p-Wert <sup>a</sup>	Gesunde Kontrollen (HC)	p-Wert <sup>b</sup>	p-Wert <sup>c</sup>
<b>Gedächtnis-/ Effektor-T-Zellen</b>							
<b>CD45RO+ CD28+CCR7+ (frühe, zentrale Gedächtnis)</b>	21,1±9,9 (20,6; 4,7-42,5)	22,3±11,3 (21,5; 6,0-42,5)	20,4±9,5 (19,9; 4,7-41,5)	0,647	19,5±7,8 (19,3; 6,2-38,8)	0,673	0,643
<b>CD45RO+ CD28+CCR7- (späte, transitionale Gedächtnis)</b>	19,6±9,4 (21,0; 2,9-3,7)	24,6±9,2 (25,3; 4,0-37,3)	17,0±8,6 (18,0; 2,9-34,2)	0,033	18,0±6,4 (18,6; 3,9-28,7)	0,328	0,010
<b>CD45RO+ CD28-CCR7+ (CCR7+ Effektor)</b>	0,3±0,2 (0,2; 0-0,8)	0,4±0,2 (0,4; 0-0,8)	0,2±0,2 (0,2; 0-0,7)	0,027	0,2±0,2 (0,1; 0-0,9)	0,114	0,027
<b>CD45RO+ CD28-CCR7- (Effektor)</b>	1,2±1,2 (0,9; 0-4,3)	1,8±1,2 (1,7; 0-4,0)	0,9±1,0 (0,7; 0,1-4,3)	0,029	1,4±1,7 (0,5; 0-6,3)	0,526	0,153
<b>CD45RO-CD28-CCR7+ (CCR7+ terminale Effektor)</b>	1,1±0,9 (0,9; 0,6-0,9)	1,3±1,1 (0,9; 0,2-3,8)	1,1±0,7 (0,9; 0,2-2,5)	0,767	0,8±0,5 (0,8; 0,1-2,5)	0,197	0,242
<b>CD45RO-CD28-CCR7- (Terminal differenzierte Effektor)</b>	1,7±5,3 (0,3; 0,1-2,7)	3,9±8,9 (0,5; 0,1-27,3)	0,5±0,5 (0,2; 0,1-2,0)	0,247	1,3±2,1 (0,3; 0-8,6)	0,521	0,641
<b>Naive T-Zellen</b>							
<b>CD45RO- CD28+CCR7+ (naive T-Zellen)</b>	51,7±19,3 47,5; 19,3-89,2)	41,5±22,0 (40,1; 19,3-87,4)	57,1±15,8 (55,9; 29,2-89,2)	0,029	55,6±11,2 (54,7; 39,1-83,7)	0,399	0,022
<b>CD45RO- CD28+CCR7- (CCR7- naive T-Zellen)</b>	3,3±2,8 (2,9; 0,5-9,7)	4,2±2,9 (3,7; 1,1-9,7)	2,9±2,6 (1,7; 0,5-9,5)	0,080	3,2±2,7 (2,3; 0,6-10,1)	0,755	0,159
<b>CD31+ TCRα/β+</b>	38,4±16,1 (37,9; 12,0-79,5)	31,3±14,8 (22,9; 17,1-60,0)	42,1±15,9 (39,9; 12,0-79,5)	0,080	39,9±12,4 (38,9; 23,7-79,4)	0,578	0,035
<b>CD31+ TCRγ/δ+</b>	0,2±0,2 (0,2; 0-0,5)	0,2±0,1 (0,2; 0,1-0,5)	0,2±0,1 (0,2; 0-0,4)	0,936	0,2±0,1 (0,2; 0,1-0,6)	0,218	0,460

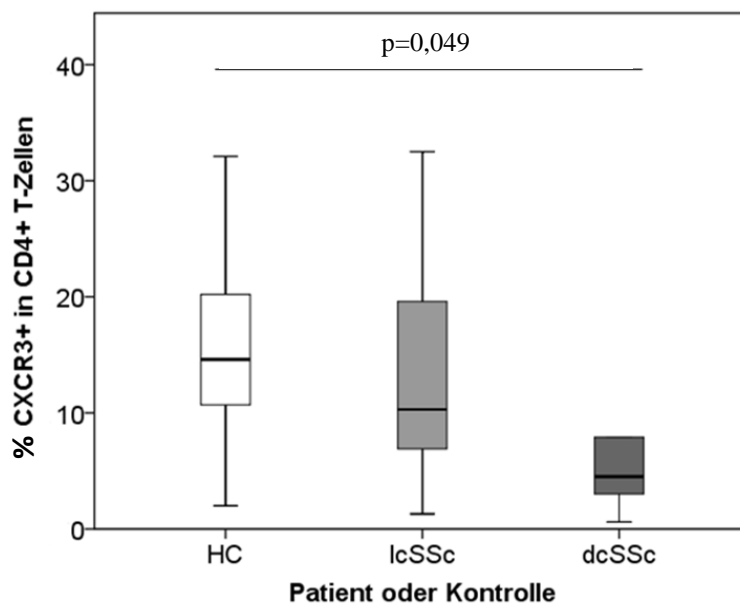
**Legende zu Tabelle 8:**

Relative Prozentwerte in Bezug zu CD4+T-Zellen. Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben (Median; Minimum - Maximum).

<sup>a</sup>Vergleich zwischen lcSSc und dcSSc. <sup>b</sup>Vergleich zwischen SSc und HC. <sup>c</sup>Vergleich zwischen dcSSc und HC.

### 3.3.2 Chemokinrezeptoren auf CD4+ T-Zellen

Die Expression von CXCR3 auf CD4+ T-Zellen, einem typischen Th1 Chemokinrezeptor, war signifikant geringer bei dcSSc-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen ( $p=0,049$ ).



#### Abbildung 5 CXCR3 in CD4+ T-Zellen

Es zeigen sich signifikant größere Proportionen der CXCR3+ T-Zellen bei Patienten mit dcSSc im Vergleich zu HC ( $p=0,049$ ). Auf der Y-Achse sind die Prozentwerte der CXCR3+ CD4+ T-Zellen als Anteil der CD4+ T-Zellen angegeben. Auf der X-Achse sind die Gruppen mit gesunden Kontrollen (HC), Patienten mit limitiert kutaner SSc (lcSSc) und Patienten mit diffus kutaner SSc (dcSSc) aufgeführt.

Eine positive Korrelation der Expression von CXCR3 auf den CD4 + T-Zellen mit dem Alter der SSc Patienten zeigte sich ( $R=0,417$ ;  $p=0,034$ ).

Bezüglich CCR5, was ebenfalls ein typischer Th1 Chemokinrezeptor ist, zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Patienten und gesunden Kontrollen. (Tabelle 9)

Die Expression von CCR5 korrelierte allerdings erwartungsgemäß hoch signifikant mit der Expression von CXCR3 in gesunden Kontrollen ( $R=0,720$ ;  $p=0,0001$ ) und SSc-Patienten ( $R=0,570$ ;  $p=0,002$ ).

**Tabelle 9 Proportionale Verteilung der Expression von Chemokinrezeptoren auf CD4+ T-Zellen in SSc-, dcSSc-, lcSSc-Patienten und Gesunden Kontrollen.**

	Systemische Sklerose (SSc)	limitiert kutane Systemische Sklerose (lcSSc)	diffus kutane Systemische Sklerose (dcSSc)	p-Wert <sup>a</sup>	Gesunde Kontrollen (HC)	p-Wert <sup>b</sup>	p-Wert <sup>c</sup>
<b>CXCR3+</b>	12,0±9,8 (8,6; 0,6 – 35,3)	13,1±8,7 (10,3; 1,3 – 32,5)	9,9±11,9 (4,5; 0,6 – 35,3)	0,241	15,0±8,0 (14,6; 2,0 – 32,1)	0,95	0,049
<b>CCR5+</b>	6,1±5,3 (5,7; 0,8 – 29,1)	5,0±2,5 (5,1; 0,8 – 8,7)	8,2±8,3 (6,3; 1,9 – 29,1)	0,339	7,0±4,3 (6,3; 0,4 – 16,2)	0,288	0,866
<b>CXCR3+ CCR5+</b>	2,7±4,4 (1,3; 0,1 – 21,9)	2,0±1,7 (0,9; 0,1 – 5,1)	4,1±7,3 (1,5; 0,2 – 21,9)	1,0	3,5±3,1 (2,6; 0,1 – 9,9)	0,109	0,460

**Legende zu Tabelle 9:**

Relative Prozentwerte in Bezug zu CD4+T-Zellen. Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben (Median; Minimum - Maximum).

<sup>a</sup>Vergleich zwischen lcSSc und dcSSc. <sup>b</sup>Vergleich zwischen SSc und HC. <sup>c</sup>Vergleich zwischen dcSSc und HC.

### 3.3.3 Intrazelluläre Zytokine der CD4+ T-Zellen

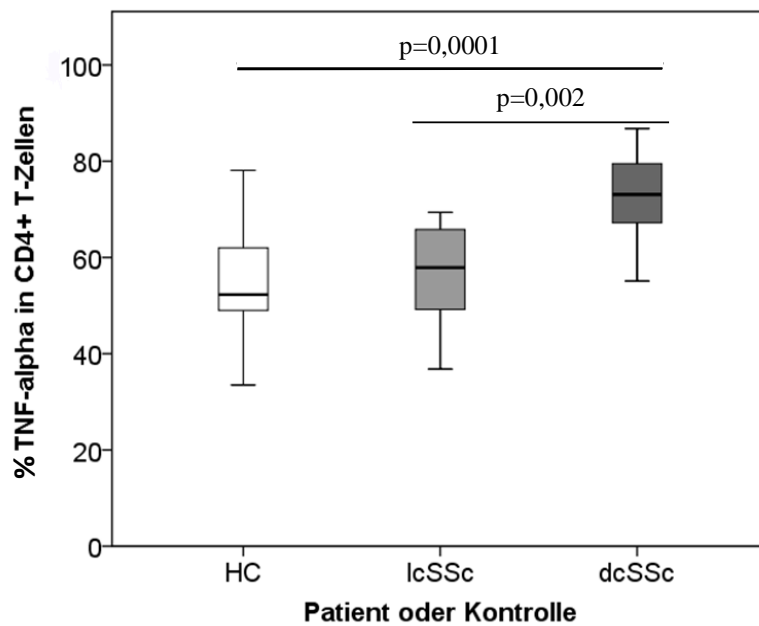
Die intrazelluläre Zytokinproduktion wurde untersucht, um die Fähigkeit der T-Zellen, Zytokine zu produzieren, abzubilden. Es erfolgte dafür eine unspezifische Stimulation der T-Zellen, wie in 2.2.5 beschrieben.

Es zeigten sich signifikant erhöhte intrazelluläre Produktionen von TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-1 und IL-9 in CD4+ T-Zellen des Blutes bei Patienten mit SSc im Vergleich zu HC (Tabelle 10).

Keine signifikanten Unterschiede ergaben sich hinsichtlich der intrazellulären Produktion von IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-4 und IL-13.

TNF- $\alpha$  Produktion war gerade bei Patienten mit dcSSc signifikant erhöht im Gegensatz zu lcSSc-Patienten (p=0,002) (Abbildung 6).

Sonst ergaben sich zwischen diesen beiden Patientengruppen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der intrazellulären Produktion von IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-1, IL-6, IL-9, IL-4 und IL-13. (Tabelle 10)



**Abbildung 6 TNF- $\alpha$  in CD4+ T-Zellen**

Im Vergleich zu HC zeigten sich bei dcSSc- ( $p=0,0001$ ) und lcSSc-Patienten ( $p=0,002$ ) größere Proportionen der TNF- $\alpha$ + CD4+ T-Zellen.

Auf der Y-Achse sind die Prozentwerte der TNF- $\alpha$ + CD4+ T-Zellen als Anteil der CD4+ T-Zellen angegeben. Auf der X-Achse sind die Gruppen mit gesunden Kontrollen (HC), Patienten mit limitiert kutaner SSc (lcSSc) und Patienten mit diffus kutaner SSc (dcSSc) aufgeführt.

Die Proportionen der TNF- $\alpha$ + CD4+ T-Zellen korrelierten mit IFN- $\gamma$ + ( $R=0,750$ ;  $p=0,002$ ), IL-13+ ( $R=0,524$ ;  $p=0,009$ ) und IL-4+ T-Zellen ( $R=0,447$ ;  $p=0,019$ ) in SSc-Patienten.

Diese Korrelation von TNF- $\alpha$ + CD4+ T-Zellen konnte bezüglich IL-13+ ( $R=0,503$ ;  $p=0,007$ ) und IL-4+ T-Zellen ( $R=0,586$ ;  $p=0,006$ ) auch bei gesunden Kontrollen nachvollzogen werden.

Ein repräsentatives Beispiel der Zytokinfärbungen in CD4+ T-Zellen bei einer gesunden Kontrolle und einem SSc-Patienten ist in Abbildung 7 dargestellt.



**Tabelle 10 Proportionale Verteilung der intrazellulären Zytokine der CD4+ T-Zellen in SSc-, dcSSc-, lcSSc-Patienten und Gesunden Kontrollen.**

Zytokin	Systemische Sklerose (SSc)	diffus kutane Systemische Sklerose (dcSSc)	limitiert kutane Systemische Sklerose (lcSSc)	p-Wert <sup>a</sup>	Gesunde Kontrollen (HC)	p Wert <sup>b</sup>	p Wert <sup>c</sup>
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	10,7 $\pm$ 7,5 (10,3; 0,9-36,6)	13,9 $\pm$ 11,0 (10,5; 3,1-36,6)	9,0 $\pm$ 4,3 (10,0; 0,9-15,8)	0,500	10,7 $\pm$ 4,9 (9,5; 3,5-25,2)	0,527	0,784
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	61,7 $\pm$ 13,3 (64,8; 36,8-86,8)	73,0 $\pm$ 10,0 (73,1; 55,1-86,8)	55,7 $\pm$ 10,7 (57,9; 36,8-69,4)	0,002	54,4 $\pm$ 10,0 (52,3; 33,5-78,1)	0,028	0,0001
<b>IL-1</b>	0,2 $\pm$ 0,2 (0,2; 0,1-0,7)	0,3 $\pm$ 0,2 (0,3; 0,1-0,5)	0,2 $\pm$ 0,2 (0,1; 0,1-0,7)	0,298	0,1 $\pm$ 0,1 (0,1; 0-0,5)	0,015	0,009
<b>IL-6</b>	0,2 $\pm$ 0,2 (0,2; 0-0,7)	0,2 $\pm$ 0,1 (0,2; 0-0,3)	0,2 $\pm$ 0,2 (0,1; 0-0,7)	0,594	0,1 $\pm$ 0,1 (0,1; 0-0,4)	0,072	0,110
<b>TGF<math>\beta</math></b>	2,7 $\pm$ 6,9 (0,3; 0,1-24,7)	7,0 $\pm$ 10,9 (0,6; 0,1-24,7)	0,4 $\pm$ 0,2 (0,3; 0,1-0,9)	0,123	0,3 $\pm$ 0,3 (0,2; 0,1-1,6)	0,011	0,014
<b>IL-4</b>	4,3 $\pm$ 2,9 (3,4; 1,1-12,3)	5,8 $\pm$ 3,8 (4,2; 1,7-12,3)	3,5 $\pm$ 2,0 (3,1; 1,1-8,1)	0,084	4,1 $\pm$ 2,1 (3,6; 1,3-9,4)	0,637	0,303
<b>IL-9</b>	0,3 $\pm$ 0,1 (0,2; 0,1-0,6)	0,3 $\pm$ 0,2 (0,3; 0,2-0,6)	0,2 $\pm$ 0,1 (0,2; 0,1-0,5)	0,087	0,2 $\pm$ 0,3 (0,1; 0-1,3)	0,004	0,002
<b>IL-13</b>	2,9 $\pm$ 2,9 (2,3; 0,6-11,9)	4,8 $\pm$ 4,3 (2,8; 0,8-11,9)	1,9 $\pm$ 0,9 (1,5; 0,6-3,5)	0,087	2,5 $\pm$ 1,7 (2,8; 0,2-6,0)	0,778	0,307

**Legende zu Tabelle 10:**

Relative Prozentwerte in Bezug zu CD4+T-Zellen. Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben (Median; Minimum - Maximum).

<sup>a</sup>Vergleich zwischen lcSSc und dcSSc. <sup>b</sup>Vergleich zwischen SSc und HC. <sup>c</sup>Vergleich zwischen dcSSc und HC.

Ein hohes inflammatorisches Potential durch signifikant erhöhte intrazelluläre IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  Produktion zeigte sich in den CD4+ CCR7+ Effektor-T-Zellen bei Patienten mit dcSSc im Vergleich zu lcSSc-Patienten und HC (siehe Abbildung 8).

Aber auch andere CD4+ T-Zell Subpopulationen wie z.B. die naiven T-Zellen, CCR7-naive T-Zellen, frühe, zentrale Gedächtnis-T-Zellen, CCR7+ terminale Effektor-T-Zellen und terminal differenzierte Effektor-T-Zellen zeigten eine signifikant höhere intrazelluläre Produktion von TNF- $\alpha$  in Patienten mit dcSSc im Vergleich zu lcSSc und HC (siehe Abbildung 8).

Die intrazelluläre IFN- $\gamma$  Produktion zeigte sich in späten, transitionalen Gedächtnis-T-Zellen signifikant vermindert bei Patienten mit dcSSc im Vergleich zu lcSSc.

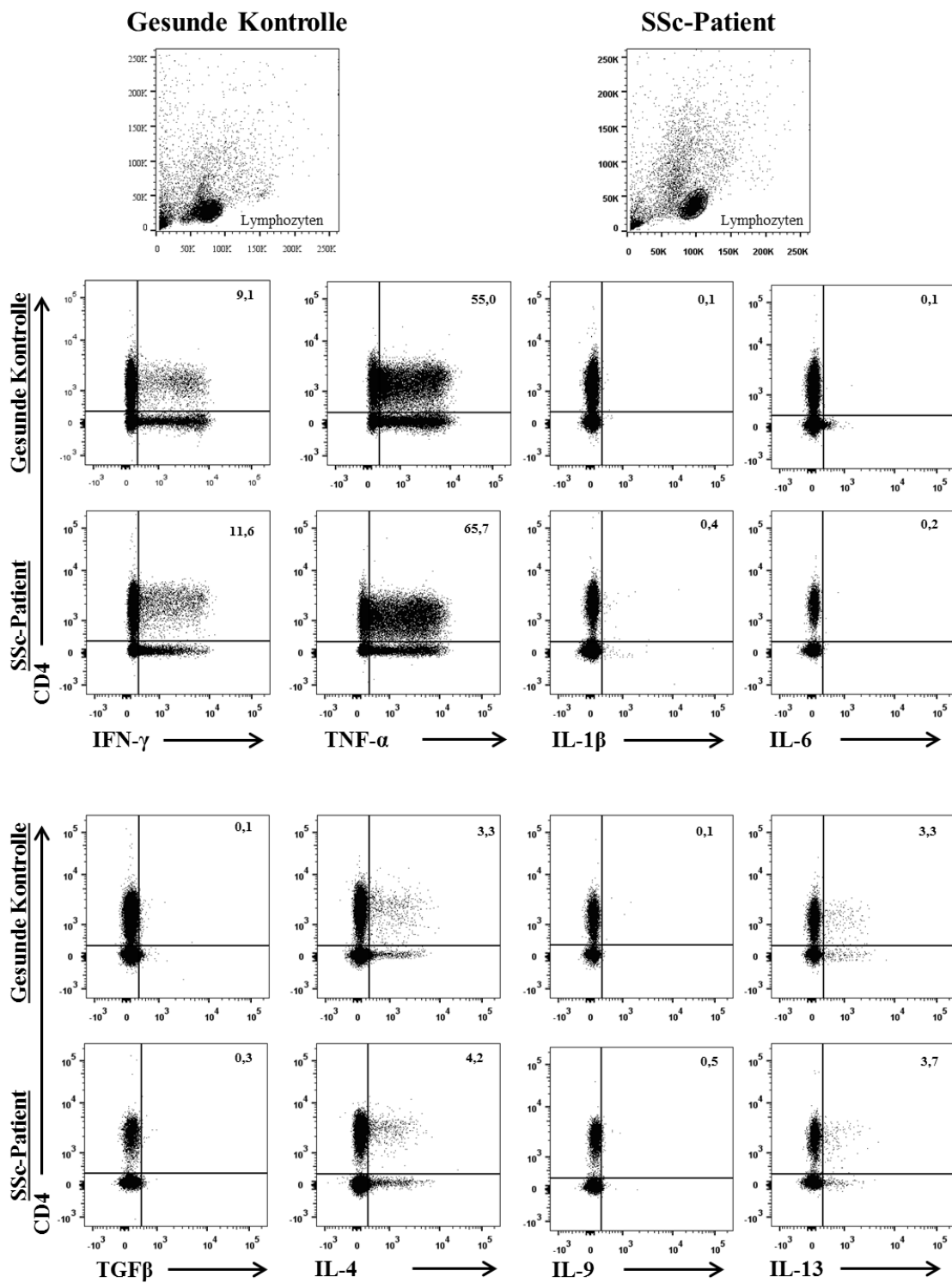
Keine signifikanten Unterschiede ergaben sich in der intrazellulären Produktion von IL-4 (einem typischen Th2-Zytokin) in den CD4+ T-Zell-Subpopulationen zwischen dcSSc-, lcSSc-Patienten und gesunden Kontrollen (siehe Abbildung 8).

Intrazelluläres IL-13 zeigte sich in CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen und naiven T-Zellen in dcSSc-Patienten im Vergleich zu HC signifikant erhöht. Bezüglich der IL-13-Produktion der anderen beschriebene CD4<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dcSSc, lcSSc und HC.

Repräsentative Beispiele für die Zytokinfärbungen mit IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 und IL-13 in den CD4<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen sind in den Abbildungen 9 – 11 dargestellt.

Die intrazelluläre Produktion von IL-1, IL-6, IL-9 und TGF- $\beta$  wurde in den CD4<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen aufgrund zu geringen Ausmaßes der positiven Events im FACS Canto II nicht untersucht. Dies wird bei Betrachtung der Abbildung 7 deutlich.

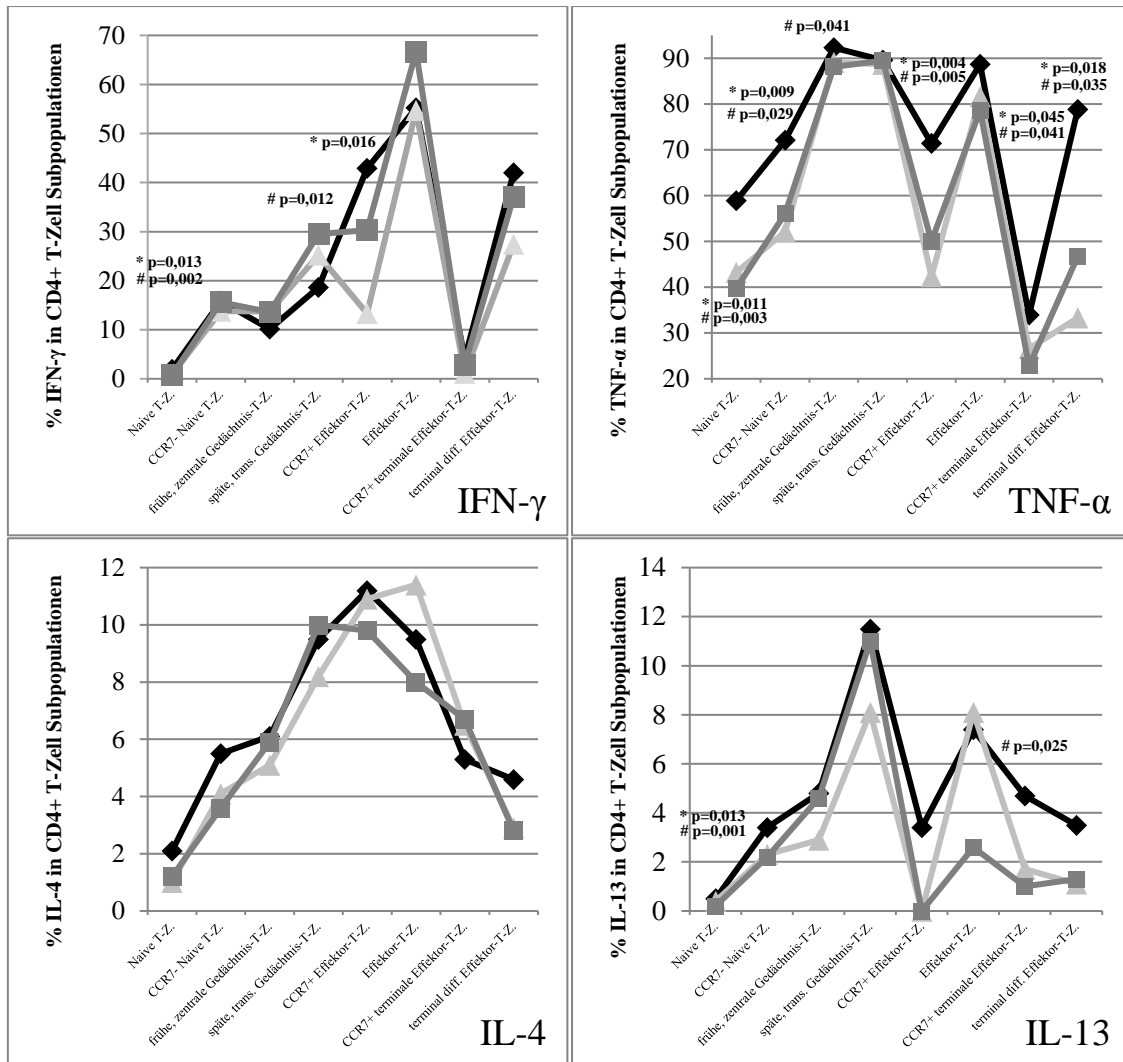
Die intrazelluläre Produktion von IL-17 wird im Kapitel der Th17-Zellen behandelt (Kapitel 3.3.4); IL-10 im Kapitel der regulatorischen T-Zellen (Kapitel 3.3.5).



**Abbildung 7** Repräsentatives Beispiel der intrazellulären Zytokine der CD4 pos. T-Zellen von SSc-Patienten und Gesunden Kontrollen.

Nach Gating der Lymphozyten wurde jeweils auf der Y-Achse CD4 aufgetragen und auf den X-Achsen das jeweils bezeichnete Zytokin. Die Zahlen in den rechten oberen Quadranten zeigen die CD4+ und Zytokin doppelt positiven Zellen als Anteil der gesamten CD4+ T-Zellen.

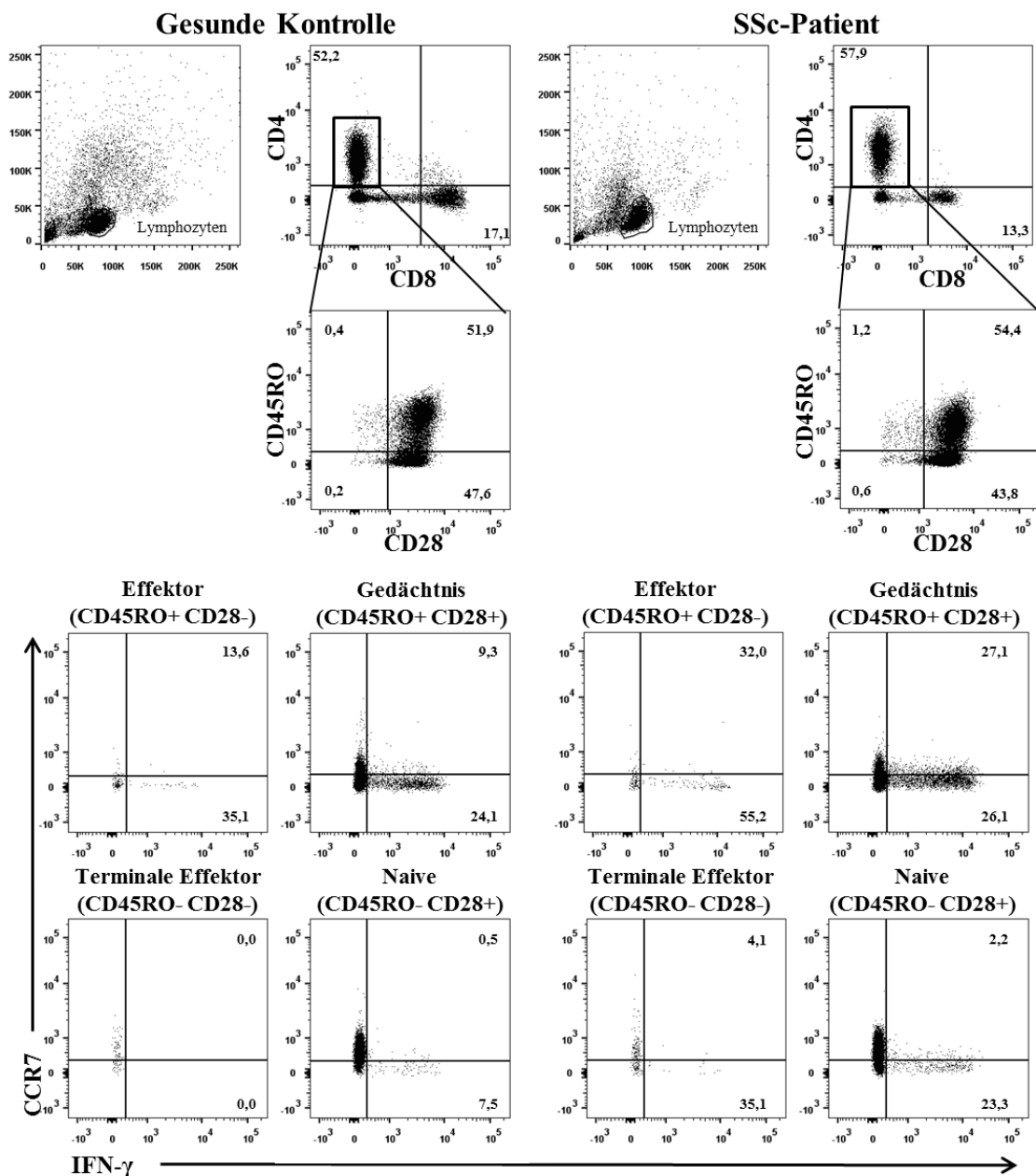
**Abbildung 8: Intrazelluläres IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 und IL-13 in verschiedenen Subpopulationen der CD4+ T-Zellen.**



**Abbildung 8:** ◆ dcSSc ▲ lcSSc ■ HC

Proportionen von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-13 und IL-4 positiven CD4+ T-Zell Subpopulationen in dcSSc- und lcSSc-Patienten sowie gesunden Kontrollen (HC). Die einzelnen Werte repräsentieren jeweils den Median.

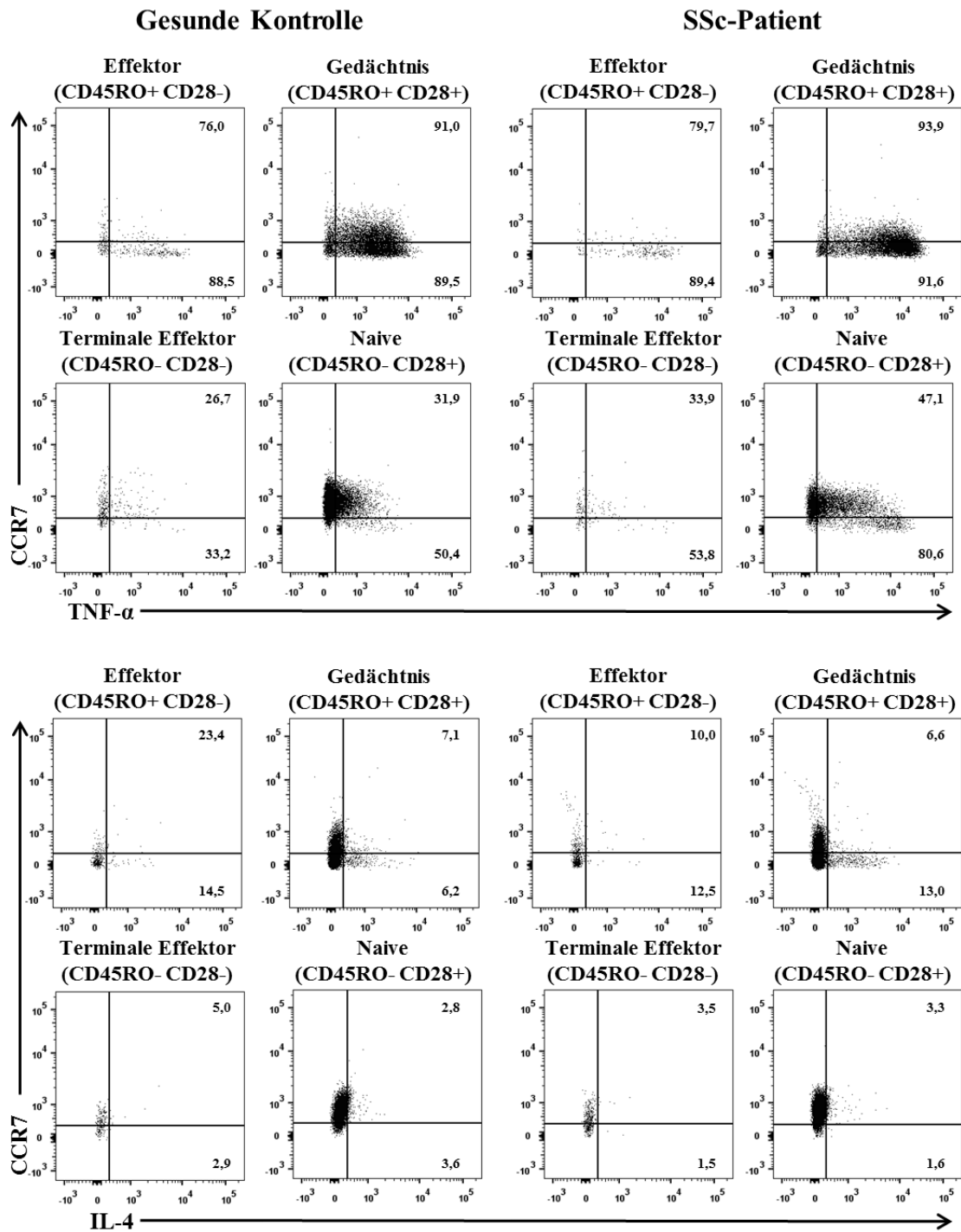
\* steht für signifikante Unterschiede zwischen lcSSc und dcSSc, # steht für signifikante Unterschiede zwischen dcSSc und HC.



**Abbildung 9: Repräsentatives Beispiel des Gatings der CD4+ Subpopulationen und deren IFN- $\gamma$  Zytokinproduktion anhand einer gesunden Kontrolle und eines SSc-Patienten.**

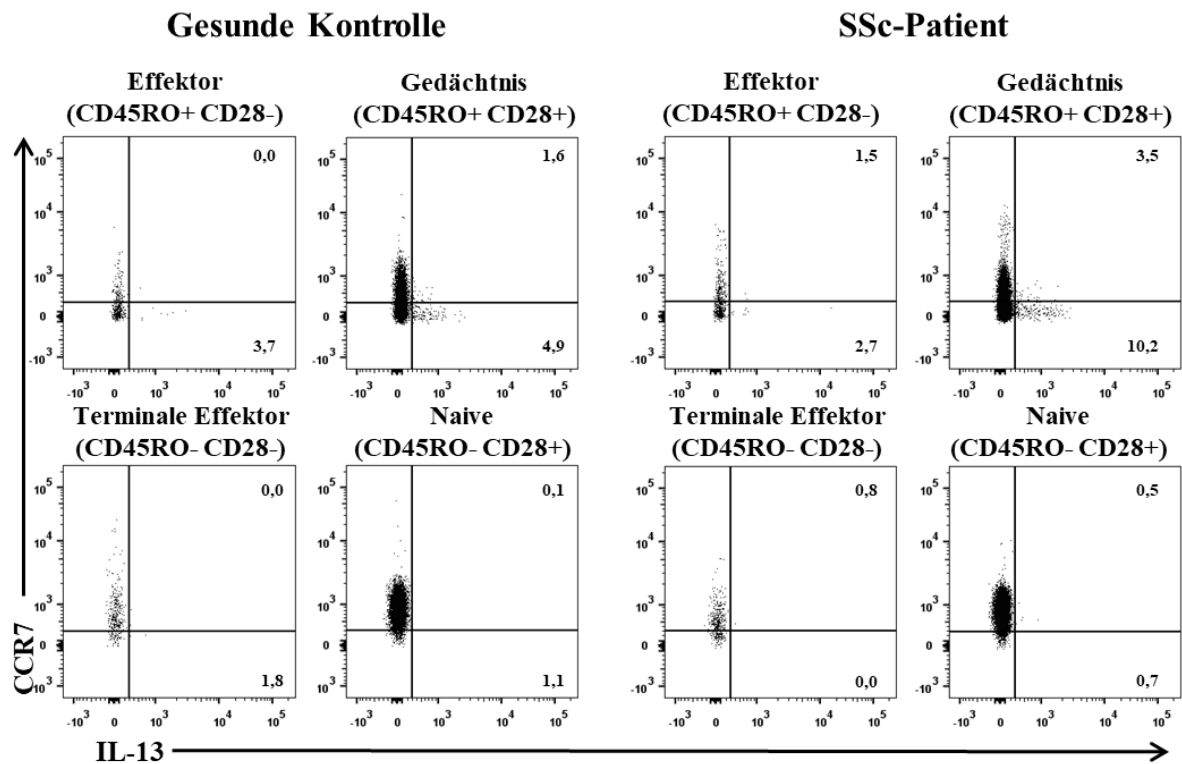
Nach Gating der Lymphozyten und CD4+ T-Zellen wurden die Effektor- (CD45RO+CD28-), Gedächtnis- (CD45RO+CD28+), frühen Gedächtnis- (CD45RO-CD28-) und naiven T-Zellen (CD45RO-CD28+) bestimmt. Die Zahlen in den Quadranten zeigen jeweils den Anteil an der übergeordneten Population.

Anschließend wurden in den jeweiligen Subpopulationen IFN- $\gamma$ + und CCR7+ Zellen identifiziert. Dort zeigen die Zahlen des rechten oberen Quadranten den Anteil der IFN- $\gamma$ + CCR7+ Zellen in allen CCR7+ Zellen dieser Population. Die Zahlen des rechten unteren Quadranten zeigen den Anteil der IFN- $\gamma$ + CCR7- Zellen in allen CCR7- Zellen dieser Population.



**Abbildung 10: Repräsentative Beispiele für TNF-α und IL-4 Zytokinproduktion in oben beschriebenen CD4+ Subpopulationen anhand einer gesunden Kontrolle und eines SSc-Patienten.**

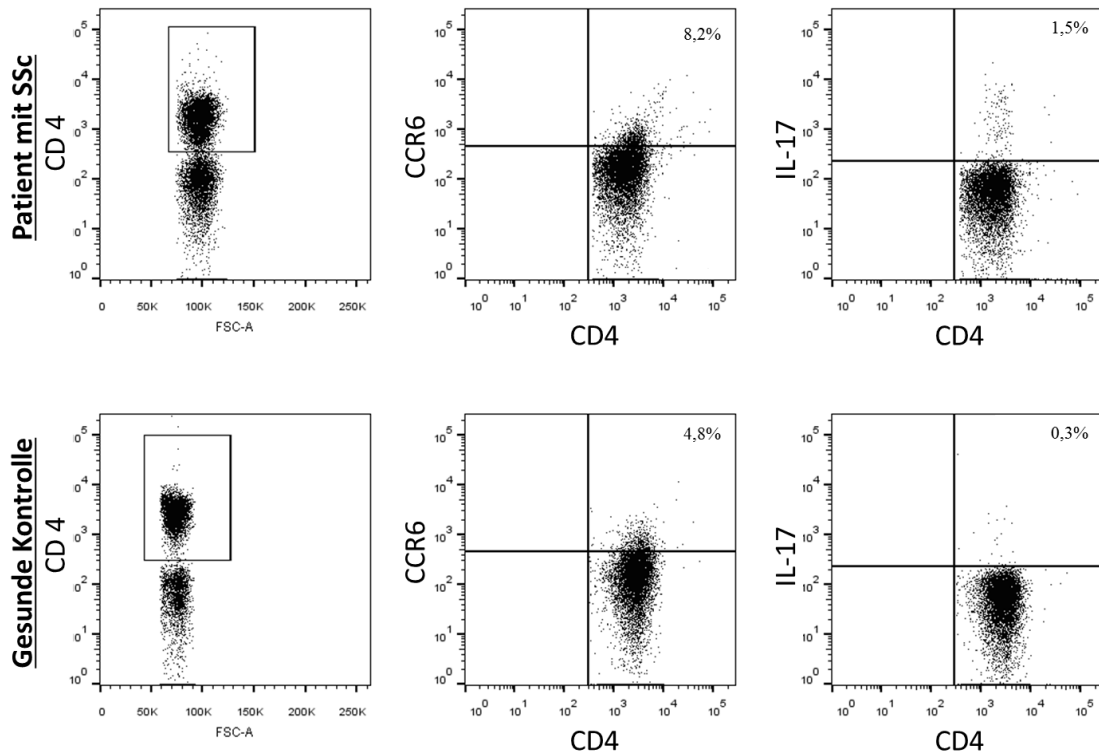
In den jeweils aufgeführten Subpopulationen wurden TNF-α +, IL-4+ und CCR7+ Zellen identifiziert. Dort zeigen die Zahlen des rechten oberen Quadranten den Anteil der CCR7+ TNF-α+ Zellen, sowie den Anteil der IL-4+ CCR7+ Zellen in allen CCR7+ Zellen dieser Population. Die Zahlen des rechten unteren Quadranten zeigen den Anteil der TNF-α+ oder IL-4+, CCR7- Zellen in allen CCR7- Zellen dieser Population.



**Abbildung 11: Repräsentatives Beispiel für die IL-13 Zytokinproduktion oben beschriebener CD4+ T-Zell Subpopulationen anhand einer gesunden Kontrolle und eines SSc-Patienten.**

In den jeweils aufgeführten Subpopulationen wurden IL-13+ und CCR7+ Zellen identifiziert. Dort zeigen die Zahlen des rechten oberen Quadranten den Anteil der IL-13+ CCR7+ Zellen in allen CCR7+ Zellen dieser Population. Die Zahlen des rechten unteren Quadranten zeigen den Anteil der IL-13+ CCR7- Zellen in allen CCR7- Zellen dieser Population.

### 3.3.4 Th-17 Zellen



**Abbildung 12 FACS Dotplots mit Färbung von CD4, CCR6 und IL-17 (intrazellulär) als repräsentatives Beispiel eines SSc-Patienten und einer gesunden Kontrolle.**

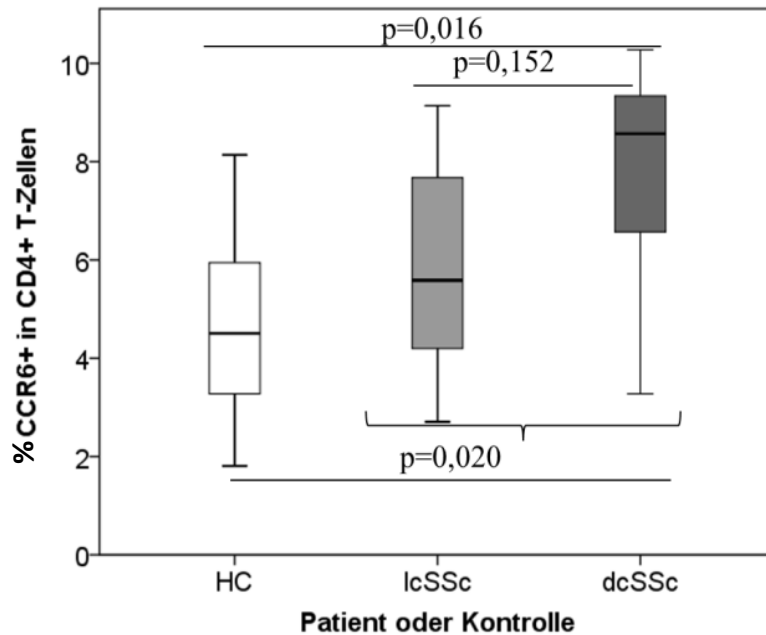
Die Zahlen stehen für den prozentualen Anteil des jeweiligen Quadranten.

CCR6 gilt als typischer Chemokinrezeptor der Th-17 Zellen. Bei Patienten mit SSc zeigten sich signifikant größere Proportionen von CD4+ T-Zellen, die diesen Chemokinrezeptor tragen ( $p=0,017$ ). Vergleicht man dcSSc-Patienten mit HC bezüglich der Expression von CCR6 auf CD4+ T-Zellen, so zeigten sich dort ebenfalls signifikant größere Proportionen bei Patienten mit dcSSc (Abbildung 13).

Zwischen lcSSc- und dcSSc-Patienten konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Expression von CCR6 gefunden werden (Tabelle 11, Abbildung 13).

Die CCR6 Expression in CD4+ T-Zellen korrelierte stark mit dem Vorhandensein einer Organbeteiligung ( $R=0,532$ ;  $p=0,006$ ).





**Abbildung 13 CCR6+ in CD4+ T-Zellen**

Es zeigen sich signifikant größere Proportionen von CCR6+ in CD4+ T-Zellen bei Patienten mit SSc (p=0,020) und vor allem dcSSc (p=0,016) gegenüber HC. Die Proportionen unterscheiden sich in lcSSc- und dcSSc-Patienten nicht voneinander (p=0,152).

Auf der Y-Achse sind die Prozentwerte der CCR6+ CD4+ T-Zellen als Anteil der CD4+ T-Zellen angegeben. Auf der X-Achse sind die Gruppen mit gesunden Kontrollen (HC), Patienten mit limitiert kutaner SSc (lcSSc) und Patienten mit diffus kutaner SSc (dcSSc) aufgeführt.

**Tabelle 11 Proportionale Verteilung der Th-17 Marker auf T-Zellen in SSc-, dcSSc-, lcSSc-Patienten und Gesunden Kontrollen.**

Population	Systemische Sklerose (SSc)	diffus kutane Systemische Sklerose (dcSSc)	limitiert kutane Systemische Sklerose (lcSSc)	p-Wert <sup>a</sup>	Gesunde Kontrollen (HC)	p Wert <sup>b</sup>	p Wert <sup>c</sup>
<b>CCR6+ in CD4+</b>	6,8±3,6 (6,6; 1,9 – 20,1)	8,4±5,2 (8,6; 1,9 – 20,1)	5,8±2,0 (5,6; 2,7 – 9,1)	0,152	4,8±1,9 (4,5; 1,8 – 10,1)	0,020	0,016
<b>CD161+ CCR6+ in CD4+</b>	2,8±1,5 (2,4; 1,0 – 6,1)	3,4±1,9 (3,9; 1,0 – 6,1)	2,5±1,2 (2,2; 1,0 – 5,6)	0,207	2,1±1,0 (2,2; 0,6 – 5,1)	0,078	0,080
<b>RORγt+ in CD4+ CCR6+</b>	80,3±10,4 (80,3; 55,8 – 99,4)	83,3±11,5 (86,6; 55,8 – 92,4)	78,7±9,8 (75,8; 58,6 – 99,4)	0,108	77,9±9,8 (78,7; 47,8 – 94,9)	0,400	0,063

**Legende zu Tabelle 11:**

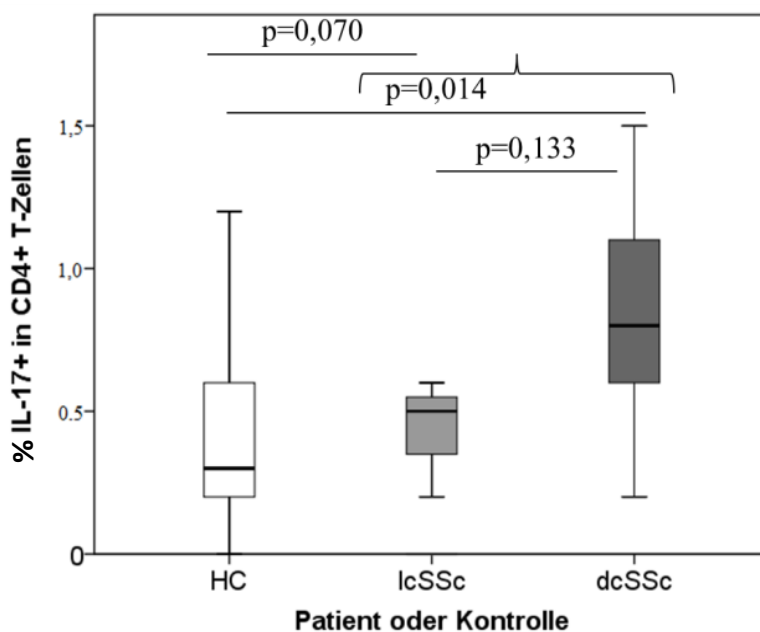
Werte sind in Prozent angegeben. Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben (Median; Minimum - Maximum).

<sup>a</sup>Vergleich zwischen lcSSc und dcSSc. <sup>b</sup>Vergleich zwischen SSc und HC. <sup>c</sup>Vergleich zwischen dcSSc und HC.

Betrachtet man die Verteilung der CCR6+ CD161+ Zellen in den CD4+ T-Zellen ergeben sich zwar zwischen SSc-Patienten und gesunden Kontrollen keine signifikanten Unterschiede, aber deutliche Trends in Richtung größerer Werte bei SSc- und vor allem dcSSc-Patienten.

ROR $\gamma$ t, Transkriptionsfaktor der Th-17-Zellen, zeigte sich in ca. 80 % aller CD4+ CCR6+ T-Zellen exprimiert. Ein eindeutiger (aber knapp nicht signifikanter) Trend zu größeren Proportionen in dcSSc Patienten gegenüber gesunden Kontrollen konnte gezeigt werden ( $p=0,063$ ) (siehe Tabelle 11).

Intrazelluläres IL-17 in CD4+ T-Zellen als Leitzytokin der Th-17 Zellen zeigte sich in dcSSc-Patienten gegenüber gesunden Kontrollen signifikant erhöht ( $p=0,014$ ). Betrachtet man die Gesamtheit der SSc-Patienten, ergab sich mit einem  $p$ -Wert von 0,070 ein knapp nicht signifikanter Trend in Richtung größerer Proportionen von IL-17 bei den SSc-Patienten (siehe Tabelle 12, Abbildung 14).



#### Abbildung 14 IL-17 in CD4+ T-Zellen

Es zeigten sich größere Proportionen von IL-17+ in CD4+ T-Zellen bei Patienten mit dcSSc ( $p=0,014$ ) im Vergleich zu HC. Keine signifikanten Unterschiede in den Proportionen von IL-17+ in CD4+ ergaben sich beim Vergleich von SSc-Patienten und HC (geschwungene Klammer,  $p=0,070$ ), sowie beim Vergleich von lcSSc-Patienten mit dcSSc-Patienten ( $p=0,133$ ). Auf der Y-Achse sind die Prozentwerte der IL-17+ CD4+ T-Zellen als Anteil der CD4+ T-Zellen angegeben. Auf der X-Achse sind die Gruppen mit gesunden Kontrollen (HC), Patienten mit limitiert kutaner SSc (lcSSc) und Patienten mit diffus kutaner SSc (dcSSc) aufgeführt.

Bezieht man die intrazelluläre IL-17 Produktion auf CD4+CCR6+ T-Zellen, zeigten sich ebenfalls klare, aber nicht signifikante Trends zu größeren Proportionen bei SSc- und v.a. dcSSc-Patienten (siehe Tabelle 12).

**Tabelle 12 Proportionale Verteilung des intrazellulären IL-17 in CD4+ T-Zellen in SSc-, dcSSc-, lcSSc-Patienten und gesunden Kontrollen.**

	Systemische Sklerose (SSc)	diffus kutane Systemische Sklerose (dcSSc)	limitiert kutane Systemische Sklerose (lcSSc)	p-Wert <sup>a</sup>	Gesunde Kontrollen (HC)	p Wert <sup>b</sup>	p Wert <sup>c</sup>
<b>IL-17+ in CD4+</b>	0,7±0,4 (0,5; 0,0 – 1,6)	0,8±0,4 (0,8; 0,02 – 1,5)	0,6±0,4 (0,5; 0,0 – 1,6)	0,133	0,4±0,3 (0,3; 0,0 – 1,2)	0,070	0,014
<b>IL-17+ in CD4+ CCR6+</b>	5,5±2,5 (5,6; 1,5 – 11,4)	6,5±2,7 (6,4; 1,9 – 11,4)	5,0±2,3 (5,2; 1,5 – 9,8)	0,107	4,7±2,6 (4,0; 1,5 – 12,4)	0,146	0,068

**Legende zu Tabelle 12:**

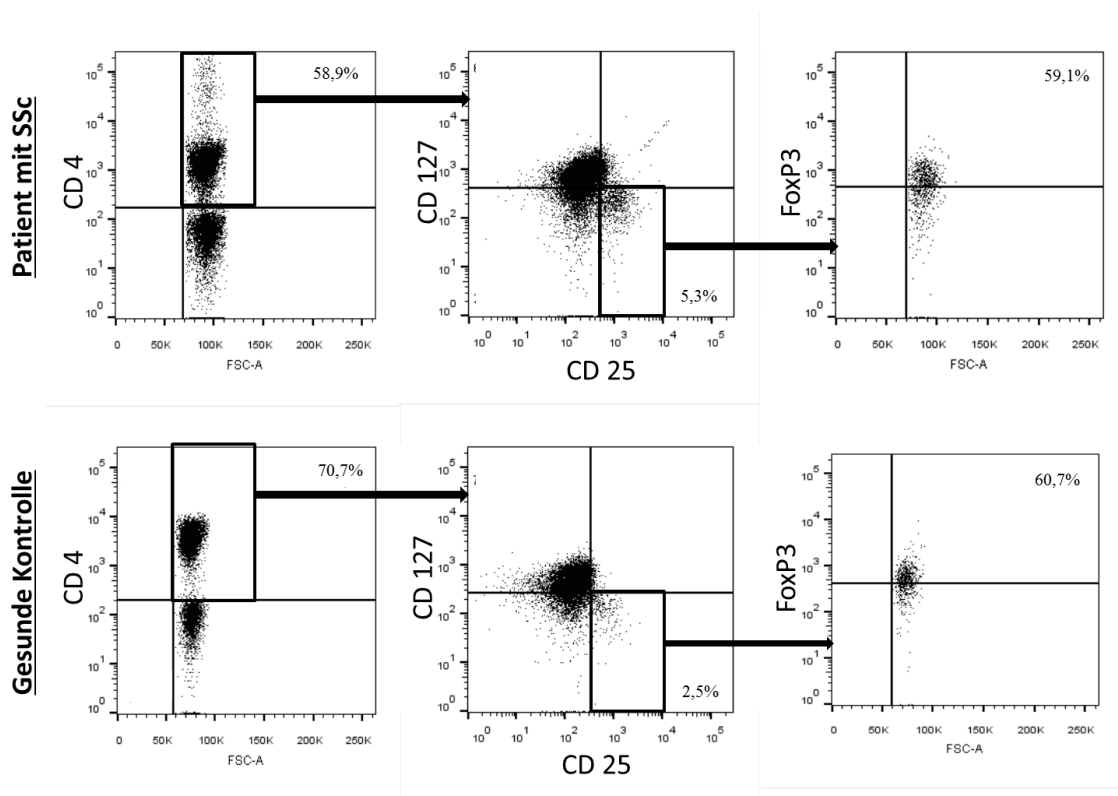
Werte sind in Prozent angegeben. Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben (Median; Minimum - Maximum).

<sup>a</sup>Vergleich zwischen lcSSc und dcSSc. <sup>b</sup>Vergleich zwischen SSc und HC. <sup>c</sup>Vergleich zwischen dcSSc und HC.

SSc-Patienten mit Organbeteiligung und ohne Organbeteiligung unterscheiden sich hinsichtlich der IL-17+ CD4+T-Zellen nicht voneinander (p=0,241). Vergleicht man allerdings die Scl-70+ Patienten mit den Scl-70- Patienten hinsichtlich der intrazellulären IL-17 Produktion, ergibt sich ein klarer Trend in Richtung größerer Proportionen bei den Scl-70+ Patienten (p=0,061).

### 3.3.5 Regulatorische T-Zellen

In Abbildung 15 ist ein repräsentatives Beispiel von FACS-Dotplots zur Färbung von Tregs mittels anti-CD4, anti-CD25, anti-CD127 und anti-FoxP3 gezeigt.



**Abbildung 15 FACS Dotplots eines SSc-Patienten und einer gesunden Kontrolle mit Färbung von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen CD4, CD25, CD127 und FOXP3 (intrazellulär) als repräsentatives Beispiel der Färbung von Tregs.**

Die Zahlen stehen für den prozentualen Anteil des jeweiligen Quadranten an der untersuchten Population.

Es zeigten sich größere Proportionen von Tregs (CD4+CD25+CD127-FoxP3+) in CD4+ T-Zellen bei Patienten mit SSc im Vergleich zu gesunden Kontrollen ( $p=0,008$ ). Zwischen den lcSSc- und dcSSc-Patienten ergaben sich keine Unterschiede (siehe Tabelle 13 und Abbildung 16).

Eine Korrelation von Tregs und IL-17+CCR6+ CD4+T-Zellen konnte in keiner Gruppe gefunden werden.

Teilt man die SSc-Patienten in eine Gruppe mit Organbeteiligung und eine Gruppe ohne, dann ergeben sich zwischen diesen beiden keine Unterschiede in den

Proportionen der Tregs ( $p=0,849$ ). Auch Scl-70 positive und negative SSc-Patienten unterschieden sich nicht hinsichtlich der Treg-Proportionen ( $p=0,809$ ).

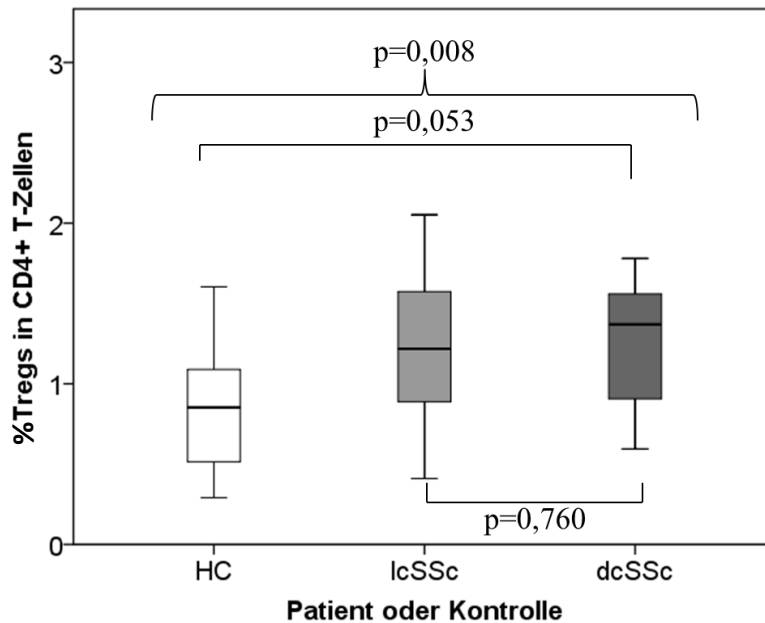
**Tabelle 13 Proportionale Verteilung von regulatorischen T-Zellen und intrazellulärem IL-10 in CD4+ T-Zellen bei SSc-, dcSSc-, lcSSc-Patienten und gesunden Kontrollen.**

	Systemische Sklerose (SSc)	diffus kutane Systemische Sklerose (dcSSc)	limitiert kutane Systemische Sklerose (lcSSc)	p-Wert <sup>a</sup>	Gesunde Kontrollen (HC)	p Wert <sup>b</sup>	p Wert <sup>c</sup>
<b>CD4+CD25+ CD127-</b>	2,8±1,3 (2,6; 0,7 – 6,7)	2,9±1,6 (2,6; 1,5 – 6,7)	2,7±1,2 (2,7; 0,7 – 5,7)	1,00	2,1±0,9 (1,1; 1,1 – 4,9)	0,005	0,041
<b>Tregs (CD4+CD25+ CD127- FOXP3+)</b>	1,4±0,8 (1,3; 0,4 – 4,6)	1,6±1,2 (1,4; 0,6 – 4,6)	1,3±0,6 (1,2; 0,4 – 3,0)	0,760	0,9±0,4 (0,3 – 2,3)	0,008	0,053
<b>IL-10+ in Tregs</b>	1,2±1,3 (0,6; 0,0 – 4,2)	1,9±1,7 (2,2; 0,0 – 4,2)	0,7±0,7 (0,5; 0,0 – 2,2)	0,095	1,9±1,2 (1,8; 0,0 – 5,1)	0,023	1,00

**Legende zu Tabelle 13:**

Werte sind in Prozent angegeben. Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben (Median; Minimum - Maximum).

<sup>a</sup>Vergleich zwischen lcSSc und dcSSc. <sup>b</sup>Vergleich zwischen SSc und HC. <sup>c</sup>Vergleich zwischen dcSSc und HC.



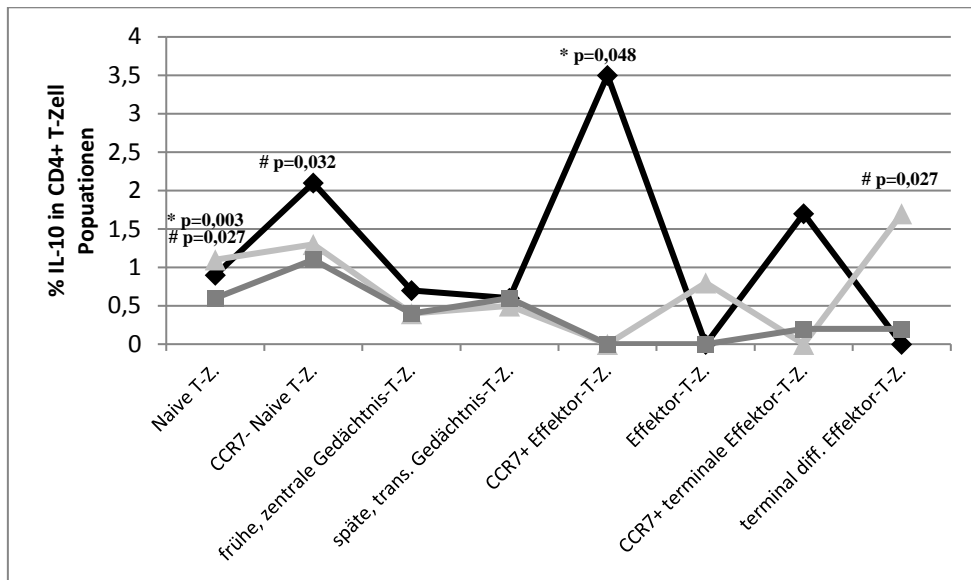
#### Abbildung 16 Tregs in CD4+ T-Zellen

Es zeigten sich signifikant größere Proportionen von Tregs in der Gesamtheit der SSc-Patienten als in gesunden Kontrollen (geschwungene Klammer,  $p=0,008$ ). Zwischen den dcSSc-Patienten und den HC zeigte sich ein knapp nicht signifikanter Unterschied ( $p=0,053$ ). Kein Unterschied zeigte sich zwischen den lcSSc- und dcSSc-Patienten ( $p=0,760$ ). Auf der Y-Achse sind die Prozentwerte der Tregs als Anteil der CD4+ T-Zellen angegeben. Auf der X-Achse sind die Gruppen mit gesunden Kontrollen (HC), Patienten mit limitiert kutaner SSc (lcSSc) und Patienten mit diffus kutaner SSc (dcSSc) aufgeführt.

IL-10 als Leitzytokin wurde auf die durchgeführte unspezifische Stimulation der PBMCs nur in sehr geringem Maße in Tregs produziert. Allerdings zeigte sich, dass SSc-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen kleinere Proportionen von IL-10+ Tregs aufwiesen (Tabelle 13).

Allerdings konnte gezeigt werden, dass IL-10 in den in 3.3.1 definierten Subpopulationen der CD4+ T-Zellen in signifikantem Maße produziert wird (Abbildung 17).

**Abbildung 17 Intrazelluläres IL-10 in CD4+ T-Zell Subpopulationen**



**Abbildung 17:** ◆ dcSSc ▲ lcSSc ■ HC

Proportionen von IL-10 positiven CD4+ T-Zell Subpopulationen in dcSSc-, und lcSSc-Patienten, sowie gesunden Kontrollen (HC). Die einzelnen Werte repräsentieren jeweils den Median.

\* steht für signifikante Unterschiede zwischen der Gesamtheit der SSc-Patienten (also lcSSc und dcSSc) und HC, # steht für signifikante Unterschiede zwischen dcSSc-Patienten und HC.

Es ergaben sich signifikant größere Proportionen von IL-10+ CD4+ naiven, CCR7-naiven und terminal differenzierten Effektor-T-Zellen bei Patienten mit dcSSc im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Außerdem zeigten sich größere Proportionen von IL-10 + CD4+ naiven und CCR7+ Effektor-T-Zellen in der Gesamtheit der SSc-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Abbildung 17).

### 3.4 CD8+ T-Zellen

#### 3.4.1 Verteilung der Naiven-/Gedächtnis-/Effektor -in CD8+ T-Zellen

Es zeigten sich keine Unterschiede in der Verteilung der CD8+ T-Zell Subpopulationen (Gedächtnis-T-Zellen, Effektor-T-Zellen und naiven T-Zellen) zwischen den SSc-Patienten und den gesunden Kontrollen. Ebenfalls konnten keine Unterschiede in der Verteilung der CD8+ T-Zell Subpopulationen zwischen lcSSc- und dcSSc-Patienten gefunden werden (Tabelle 14).

Signifikante Unterschiede ergaben sich zwischen dcSSc-Patienten und gesunden Kontrollen hinsichtlich der Proportionen von CD31+ TCR $\alpha/\beta$ + in den CD8+ T-Zellen. Es zeigten sich signifikant kleinere Proportionen dieser Population in Patienten mit dcSSc (p=0,041). Bezeichnet wurde diese Population als RTE (rezente Thymus Emigranten).



**Tabelle 14 Proportionale Verteilung der CD8+ T-Zell Subpopulationen in SSc-, dcSSc-, lcSSc-Patienten und gesunden Kontrollen.**

Subpopulation	Systemische Sklerose (SSc)	diffus kutane systemische Sklerose (dSSc)	Limitiert kutane systemische Sklerose (lSSc)	P-Wert <sup>a</sup>	Gesunde Kontrollen (HC)	P Wert <sup>b</sup>	P - Wert <sup>c</sup>
<b>Gedächtnis-/ Effektor-T-Zellen</b>							
<b>CD45RO+ CD28+CCR7+ (frühe, zentrale Gedächtnis)</b>	6,3±5,7 (4,7; 0,6-23,2)	5,5±5,2 (4,4; 0,6-18,0)	6,7±6,0 (4,8; 2,3-23,2)	0,571	4,4±2,6 (3,9; 0,5-11,6)	0,262	0,810
<b>CD45RO+ CD28-CCR7+ (CCR7+ Effektor)</b>	0,4±0,4 (0,4; 0-1,9)	0,6±0,6 (0,4; 0-1,9)	0,4±0,2 (0,3; 0,1-0,9)	0,384	0,3±0,2 (0,2; 0,1-0,8)	0,229	0,154
<b>CD45RO+ CD28-CCR7- (Effektor)</b>	7,9±8,5 (4,4; 0,7-32,9)	10,2±11,6 (3,9; 0,9-32,9)	6,7±6,4 (4,4 (0,7±26,8)	0,829	5,7±4,4 (4,1; 0,6-15,4)	0,607	0,571
<b>CD45RO- CD28-CCR7- (Terminal diff. Effektor)</b>	18,8±17,4 (12,5; 2,0-77,0)	21,8± 23,6 (13,3; 3,3-77,0)	17,2±13,7 (12,1; 2,0-47,4)	0,936	21,4±13,2 (22,6; 1,4-45,1)	0,245	0,503
<b>Naive T-Zellen</b>							
<b>CD45RO- CD28+CCR7+ (naive T-Zellen)</b>	37,4±24,5 (34,6; 2,3-75,6)	33,3±25,3 (24,8; 2,3-69,9)	39,6±24,6 (44,1; 5,9-75,6)	0,609	45,3±17,6 (43,6; 19,3-76,3)	0,183	0,135
<b>CD31+TCRα/β+ (RTE)</b>	58,1±20,1 (59,6; 17,9-86,6)	49,3±22,4 (44,2; 17,9-86,6)	62,7±17,8 (61,5; 29,1-85,4)	0,169	67,8±13,8 (70,0; 28,7-86,6)	0,082	0,041
<b>CD31+TCRγ/δ+ (RTE)</b>	5,6±8,7 (3,1; 0,2-42,7)	5,3±6,6 (3,3; 0,2-22,4)	5,8±9,9 (3,0; 0,5-42,7)	0,647	4,8±4,2 (3,7; 0,3-20,9)	0,428	0,643

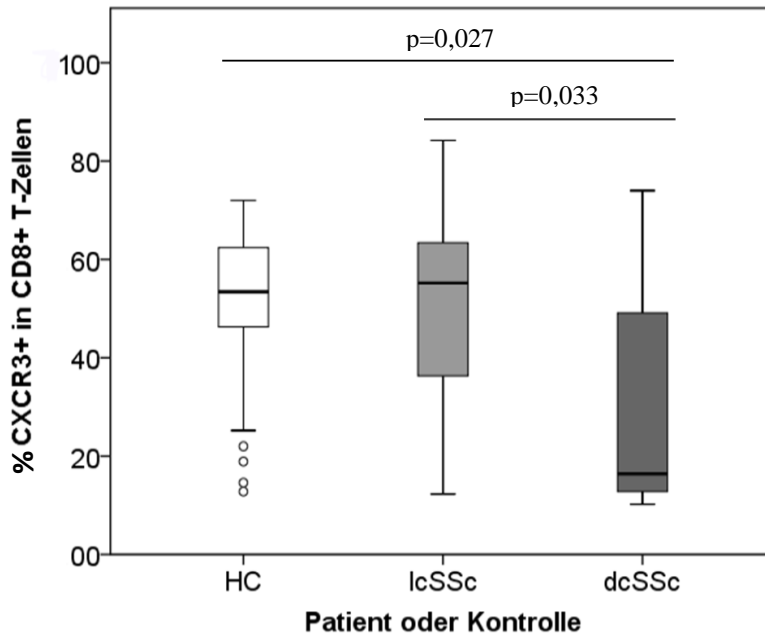
**Legende zu Tabelle 14:**

Relative Prozentwerte in Bezug zu CD8+T-Zellen. Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben (Median; Minimum - Maximum).

<sup>a</sup>Vergleich zwischen lcSSc und dcSSc. <sup>b</sup>Vergleich zwischen SSc und HC. <sup>c</sup>Vergleich zwischen dcSSc und HC

### 3.4.2 Chemokinrezeptoren auf CD8+ T-Zellen

Größere Proportionen von CXCR3 Expression auf CD8+ T-Zellen konnten bei Patienten mit dcSSc im Vergleich zu HC und lcSSc-Patienten gezeigt werden ( $p=0,027$ , Abbildung 18).



**Abbildung 18 CXCR3+ in CD8+ T-Zellen**

Es zeigten sich signifikant größere Proportionen von CXCR3+ in CD8+ T-Zellen bei dcSSc-Patienten im Vergleich zu lcSSc-Patienten ( $p=0,033$ ) und gesunden Kontrollen ( $p=0,027$ ). Auf der Y-Achse sind die Prozentwerte der CXCR3+ CD8+ T-Zellen als Anteil der CD8+ T-Zellen angegeben. Auf der X-Achse sind die Gruppen mit gesunden Kontrollen (HC), Patienten mit limitiert kutaner SSc (lcSSc) und Patienten mit diffus kutaner SSc (dcSSc) aufgeführt.

Keine signifikanten Unterschiede zeigten sich hinsichtlich der Proportionen von CCR5 und CCR6 exprimierenden CD8+ T-Zellen zwischen den SSc-Patienten und gesunden Kontrollen.

Proportionen von CD161+CCR6+ CD8+ T-Zellen zeigten sich größer in SSc-Patienten als in gesunden Kontrollen ( $p=0,024$ ) (Tabelle 15).

Sowohl in gesunden Kontrollen als auch in dcSSc-Patienten korrelierte die Expression von CXCR3 und CCR5 (HC:  $R=0,573$ ;  $p=0,001$ ; SSc:  $R=0,715$ ,  $p=0,0001$ ).

Außerdem zeigte sich eine signifikant positive Korrelation des Alters und der Expression von CXCR3 in Patienten mit SSc ( $R=0,416$ ,  $p=0,034$ ).

**Tabelle 15 Proportionale Verteilung der Chemokinrezeptoren auf CD8+ T-Zellen in SSc-, dcSSc-, lcSSc-Patienten und Gesunden Kontrollen.**

Subpopulation	Systemische Sklerose (SSc)	diffus kutane systemische Sklerose (dSSc)	Limitiert kutane systemische Sklerose (lSSc)	p-Wert <sup>a</sup>	Gesunde Kontrollen (HC)	p Wert <sup>b</sup>	p - Wert <sup>c</sup>
<b>Chemokinrezeptoren</b>							
<b>CCR5+</b>	20,2±18,5 (13,3; 0-68,0)	20,1±19,5 (11,5; 3,0-52,7)	20,2±18,6 (15,2; 0-68,0)	0,893	18,4±11,3 (15,2; 0-45,2)	0,661	0,619
<b>CXCR3+</b>	43,5±23,6 (47,8; 10,2-84,2)	30,7±23,7 (16,4; 10,2-74,0)	50,2±21,2 (55,2; 12,3-84,2)	0,033	49,6±16,9 (53,4; 12,8-72,0)	0,316	0,027
<b>CCR6+</b>	9,4±5,8 (7,9; 1,30-22,4)	7,7±6,9 (4,3; 1,3-21,9)	10,4±5,1 (8,4; 4,6-22,4)	0,113	9,5±4,4 (8,6; 3,9-20,6)	0,775	0,175
<b>CD161+CCR6+</b>	1,3±2,4 (0,7; 0,2-12,6)	2,0±4,0 (0,7 0,3-12,6)	0,9±0,9 (0,8; 0,2-3,9)	0,932	1,1±0,5 (1,0; 2,6-0,7)	0,024	0,091

**Legende zu Tabelle 15:**

Relative Prozentwerte in Bezug zu CD8+T-Zellen. Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben (Median; Minimum - Maximum).

<sup>a</sup>Vergleich zwischen lcSSc und dcSSc. <sup>b</sup>Vergleich zwischen SSc und HC. <sup>c</sup>Vergleich zwischen dcSSc und HC

### 3.4.3 Intrazelluläre Zytokinproduktion der CD8+ T-Zellen

Untersucht wurde wie auch bei CD4+ T-Zellen (siehe 3.3.3) die intrazelluläre Zytokinproduktion in CD8+ T-Zellen auf einen unspezifischen Stimulus.

Die Proportionen der Th1-Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 unterschieden sich nicht zwischen Patienten mit SSc und gesunden Kontrollen (siehe Tabelle 16).

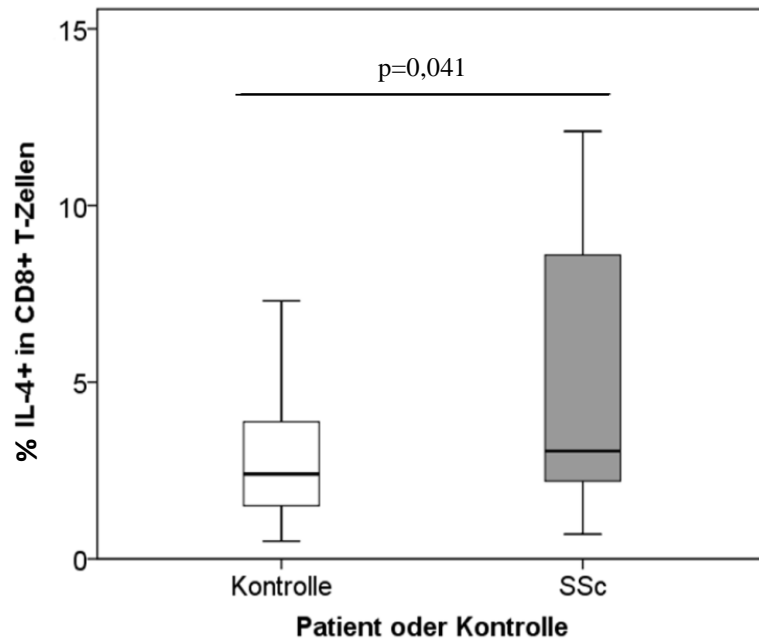
Bezüglich der Th2-Zytokine TGF- $\beta$ , IL-4 und IL-13 zeigten sich signifikant größere Proportionen dieser Zytokine in CD8+T-Zellen von Patienten mit dcSSc im Vergleich zu gesunden Kontrollen:

TGF- $\beta$  wurde bei Patienten mit dcSSc in größeren Proportionen zu lcSSc-Patienten (p=0,015) und zu gesunden Kontrollen (p=0,002) gefunden. Betrachtet man die Gesamtheit der Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen ergab sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied in der intrazellulären TGF- $\beta$  Produktion (p=0,002).

Die IL-4 Proportionen zeigten sich im Vergleich zu gesunden Kontrollen in CD8+ T-Zellen von SSc-Patienten signifikant vergrößert (p=0,041) (Abbildung 19).

Außerdem ergaben sich signifikant größere Proportionen von IL-13 in CD8+T-Zellen

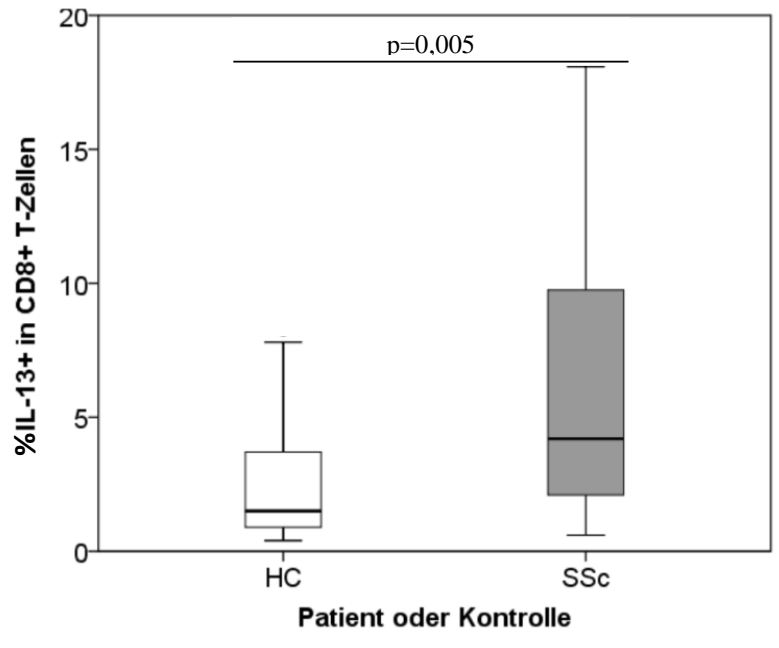
bei Patienten mit SSc, vor allem dcSSc im Vergleich zu HC ( $p=0,005$ ;  $p=0,015$ ). Die IL-4 und IL-13 Produktion korrelierten positiv in HC ( $R=0,882$ ;  $p=0,0001$ ) und SSc-Patienten ( $R=0,886$ ;  $p=0,0001$ ) miteinander.



**Abbildung 19 Intrazelluläre IL-4 Produktion in CD8+ T-Zellen**

Es zeigten sich größere Proportionen von intrazellulärem IL-4 in CD8+ T-Zellen in SSc-Patienten im Vergleich zu HC ( $p=0,041$ ).

Auf der Y-Achse sind die Prozentwerte der IL-4+ CD8+ T-Zellen als Anteil der CD8+ T-Zellen angegeben. Auf der X-Achse sind die Gruppen mit gesunden Kontrollen (HC), Patienten mit limitiert kutaner SSc (lcSSc) und Patienten mit diffus kutaner SSc (dcSSc) aufgeführt.



**Abbildung 20 Intrazelluläre IL-13 Produktion in CD8+ T-Zellen**

Es zeigten sich größere Proportionen von intrazellulärem IL-13 in CD8+ T-Zellen in SSc-Patienten im Vergleich zu HC (p=0,005).

Auf der Y-Achse sind die Prozentwerte der IL-13+ CD8+ T-Zellen als Anteil der CD8+ T-Zellen angegeben. Auf der X-Achse sind die Gruppen mit gesunden Kontrollen (HC), Patienten mit limitiert kutaner SSc (lcSSc) und Patienten mit diffus kutaner SSc (dcSSc) aufgeführt.

Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Untersuchten Gruppen fanden sich hinsichtlich der intrazellulären IL-9-Produktion (Tabelle 16).

Ein repräsentatives Beispiel für die Färbungen von CD8+ T-Zellen und den untersuchten Zytokinen zeigt Abbildung 21.

**Tabelle 16 Proportionale Verteilung der intrazellulären Zytokine in CD8+ T-Zellen in SSc-, dcSSc-, lcSSc-Patienten und gesunden Kontrollen.**

	Systemische Sklerose (SSc)	Diffuse kutane Systemische Sklerose (dcSSc)	Limitiert kutane Systemische Sklerose (lcSSc)	p-Wert <sup>a</sup>	Gesunde Kontrollen (HC)	p Wert <sup>b</sup>	p Wert <sup>c</sup>
<b>Th1-Zytokine</b>							
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	39,5±24,2 (30,0; 7,8-86,5)	38,8±28,2 (29,7; 7,8-81,9)	39,9±22,8 (30,3; 13,3-86,5)	0,767	38,7±16,1 (38,7; 11,0-74,6)	0,736	0,797
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	56,7±25,6 (52,4; 18,3-94,1)	61,3±24,5 (62,4; 24,5-94,1)	54,3±26,5 (49,2; 18,3-92,8)	0,535	48,7±17,6 (49,9; 17,2-77,4)	0,296	0,164
<b>IL-1</b>	0,5±0,5 (0,3; 0-2,5)	0,3±0,3 (0,2; 0-1,1)	0,6±0,6 (0,4; 0,1-2,5)	0,321	0,3±0,2 (0,3; 0-1,0)	0,613	0,600
<b>IL-6</b>	0,5±3,6 (0,5; 0-1,5)	0,5±0,4 (0,3; 0,1-1,4)	0,5±0,4 (0,6; 0-1,5)	0,480	0,5±0,6 (0,2; 0-3,0)	0,124	0,375
<b>Th2 Zytokine</b>							
<b>TGF<math>\beta</math></b>	4,5±9,1 (1,3; 0,2-32,8)	9,7±13,9 (3,0; 0,3-32,8)	1,8±2,9 (1,0; 0,2-12,0)	0,015	0,9±0,8 (0,6; 0,2-4,2)	0,002	0,002
<b>IL-4</b>	5,3±5,1 (3,1; 0,7-23,6)	6,8±7,2 (2,8; 1,3-23,6)	4,5±3,5 (3,2; 0,7-12,1)	0,647	2,9±2,0 (2,4; 0,5-8,6)	0,041	0,077
<b>IL-9</b>	0,7±0,4 (0,7; 0-1,8)	0,7±0,5 (0,5; 0,1-1,8)	0,7±0,4 (0,7; 0-1,4)	0,629	0,5±0,6 (0,2; 0-1,8)	0,086	0,425
<b>IL-13</b>	7,0±7,6 (4,2; 0,6-33,1)	9,3±10,5 (5,2; 1,0-33,1)	5,7±5,5 (3,8; 0-1,4)	0,366	2,7±2,7 (1,5; 0,4-10,7)	0,005	0,015
<b>Th17 Zytokin</b>							
<b>IL-17</b>	0,4±0,35 (0,3; 0,0-1,5)	0,4±0,5 (0,2; 0,1-1,5)	0,4±0,3 (0,3; 0,0-0,8)	0,760	0,3±0,2 (0,2; 0,1-0,9)	0,116	0,787
<b>Regulatorisches Zytokin</b>							
<b>IL-10</b>	1,3±0,9 (1,0; 0,3-4,3)	1,5±1,2 (1,2; 0,3-4,3)	1,1±0,7 (0,9; 0,4-3,2)	0,513	0,9±0,6 (0,7; 0,2-2,5)	0,036	0,084

**Legende zu Tabelle 16:**

Relative Prozentwerte in Bezug zu CD8+T-Zellen. Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben (Median; Minimum - Maximum).

<sup>a</sup>Vergleich zwischen lcSSc und dcSSc. <sup>b</sup>Vergleich zwischen SSc und HC. <sup>c</sup>Vergleich zwischen dcSSc und HC

Die Proportionen von IL-17 in CD8+ T-Zellen zeigten keine Unterschiede in den untersuchten Gruppen (dcSSc, lcSSc, HC) (Tabelle 16). Es zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede in der IL-17-Produktion von CD8+CCR6+CD161+ T-Zellen zwischen SSc-Patienten und gesunden Kontrollen (p=0,336).

Ein signifikanter Unterschied konnte zwischen den SSc-Patienten und gesunden Kontrollen hinsichtlich der intrazellulären IL-10 Produktion in CD8+ T-Zellen gezeigt

werden ( $p=0,036$ ). Dabei fanden sich größere Proportionen von IL-10+ CD8+ T-Zellen in SSc-Patienten, vor allem mit dcSSc (Tabelle 16).

Es folgte ebenfalls eine Untersuchung der genannten Zytokine in Subpopulationen, wie naiven, frühen, zentralen Gedächtnis-, späten, transitionalen Gedächtnis- und Effektor-T-Zellen sowie terminalen Effektor-T-Zellen.

Bezüglich der Proportionen von intrazellulärem IFN- $\gamma$  zeigten sich signifikant größere Proportionen von IFN- $\gamma$ + Zellen in frühen, zentralen Gedächtnis-T-Zellen bei gesunden Kontrollen im Vergleich zu dcSSc-Patienten ( $p= 0,041$ ) und in späten, transitionalen Gedächtnis-T-Zellen bei gesunden Kontrollen im Vergleich zu allen SSc-Patienten ( $p=0,018$ ). In den anderen Subpopulationen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen (siehe Abbildung 22).

Naive CD8+ T-Zellen von SSc-Patienten und vor allem dcSSc-Patienten wiesen signifikant größere Proportionen von intrazellulärem TNF- $\alpha$  auf als naive T-Zellen von gesunden Kontrollen ( $p=0,001$ ).

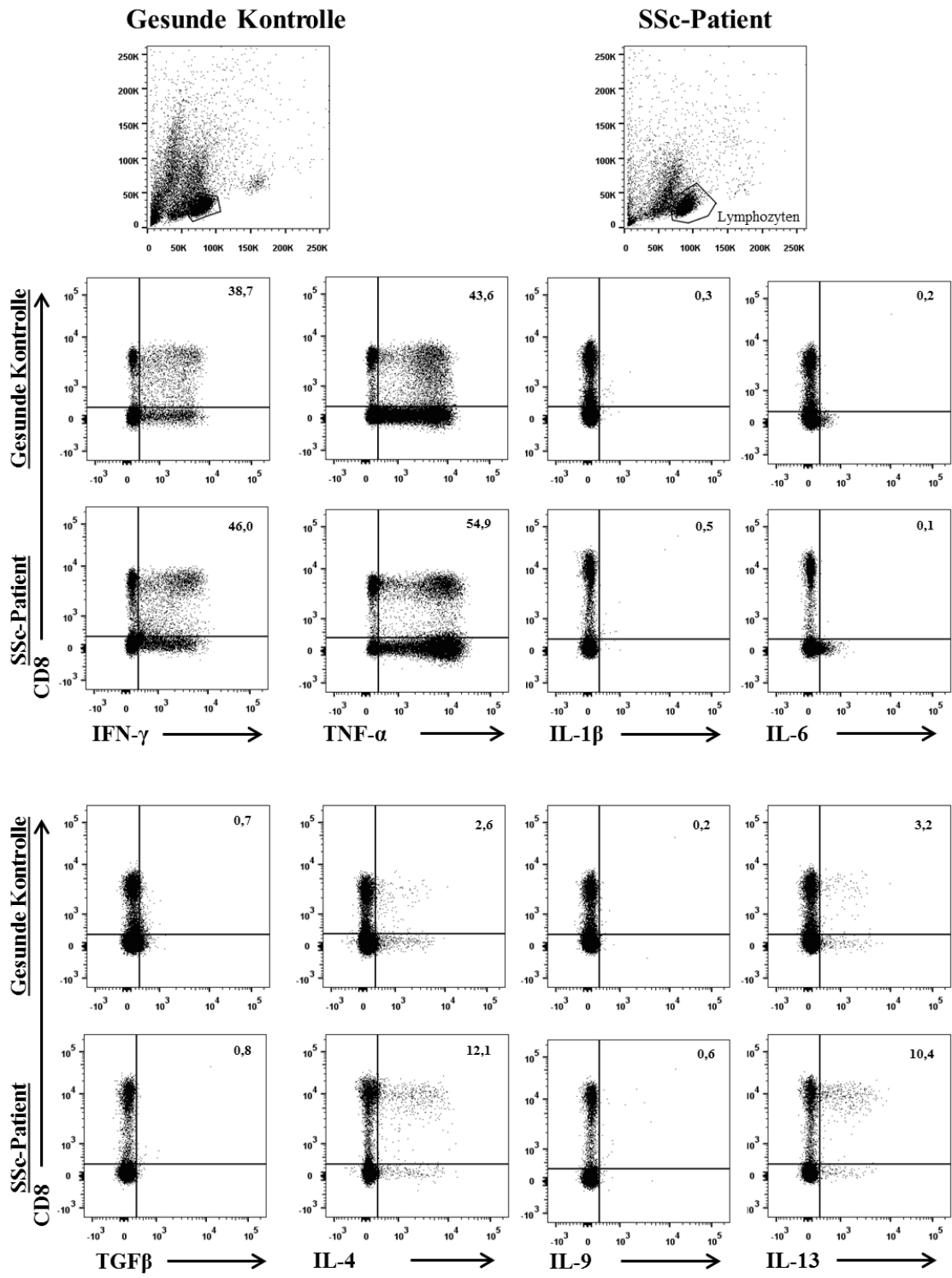
In den restlichen untersuchten Subpopulationen ergaben sich bezüglich TNF- $\alpha$  keine signifikanten Unterschiede zwischen SSc-Patienten und HC, sowie zwischen lcSSc-Patienten und dcSSc-Patienten (siehe Abbildung 22). Auf der Suche nach unabhängigen Variablen, die die TNF- $\alpha$  Produktion in CD8+ T-Zellen beeinflussen, zeigt sich in einer multiplen Regressionsanalyse bezüglich Patientenalter, Geschlecht, Krankheitsdauer, Vorhandensein von Autoantikörpern (Scl70 und anti-Zentromer Antikörper), Organbeteiligung, BSG, CRP und Therapie mit MTX, Kortison und Azathioprin ( $R^2=0,580$ ,  $p=0,014$ ), dass die TNF- $\alpha$  Produktion durch Alter ( $p=0,040$ ) und anti-Zentromer Antikörper ( $p=0,002$ ) beeinflusst wird.

Bei der Analyse der Proportionen von IL-4+ CD8+ T-Zellen zeigte sich, dass frühe, zentrale Gedächtnis-T-Zellen von Patienten mit dcSSc signifikant vermehrt waren im Vergleich zu gesunden Kontrollen ( $p=0,046$ ). In den anderen untersuchten Subpopulationen zeigten sich keine Unterschiede in der Verteilung der IL-4+ Zellen (siehe Abbildung 22).

Interessanterweise ergaben sich auch bei IL-13, einem weiteren Th2-Zytokin, Unterschiede in den Proportionen in den CD8+ T-Zell Subpopulationen. So zeigten sich beispielsweise deutlich größere Proportionen von IL-13+ Zellen in frühen, zentralen Gedächtnis-T-Zellen bei Patienten mit dcSSc im Vergleich zu HC ( $p=0,005$ ) und bei allen SSc Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen ( $p=0,003$ ). Späte, transitionale Gedächtniszellen wiesen signifikant größere Proportionen von IL-13+ Zellen in dcSSc-Patienten auf, als in gesunden Kontrollen ( $p=0,031$ ) (siehe Abbildung 22).

Repräsentative Beispiele für die Zytokinproduktion der identifizierten CD8+ T-Zell-Subpopulationen zeigen die Abbildung 24, Abbildung 25 und Abbildung 26 für jeweils einen SSc-Patienten und eine gesunde Kontrolle zum Vergleich.

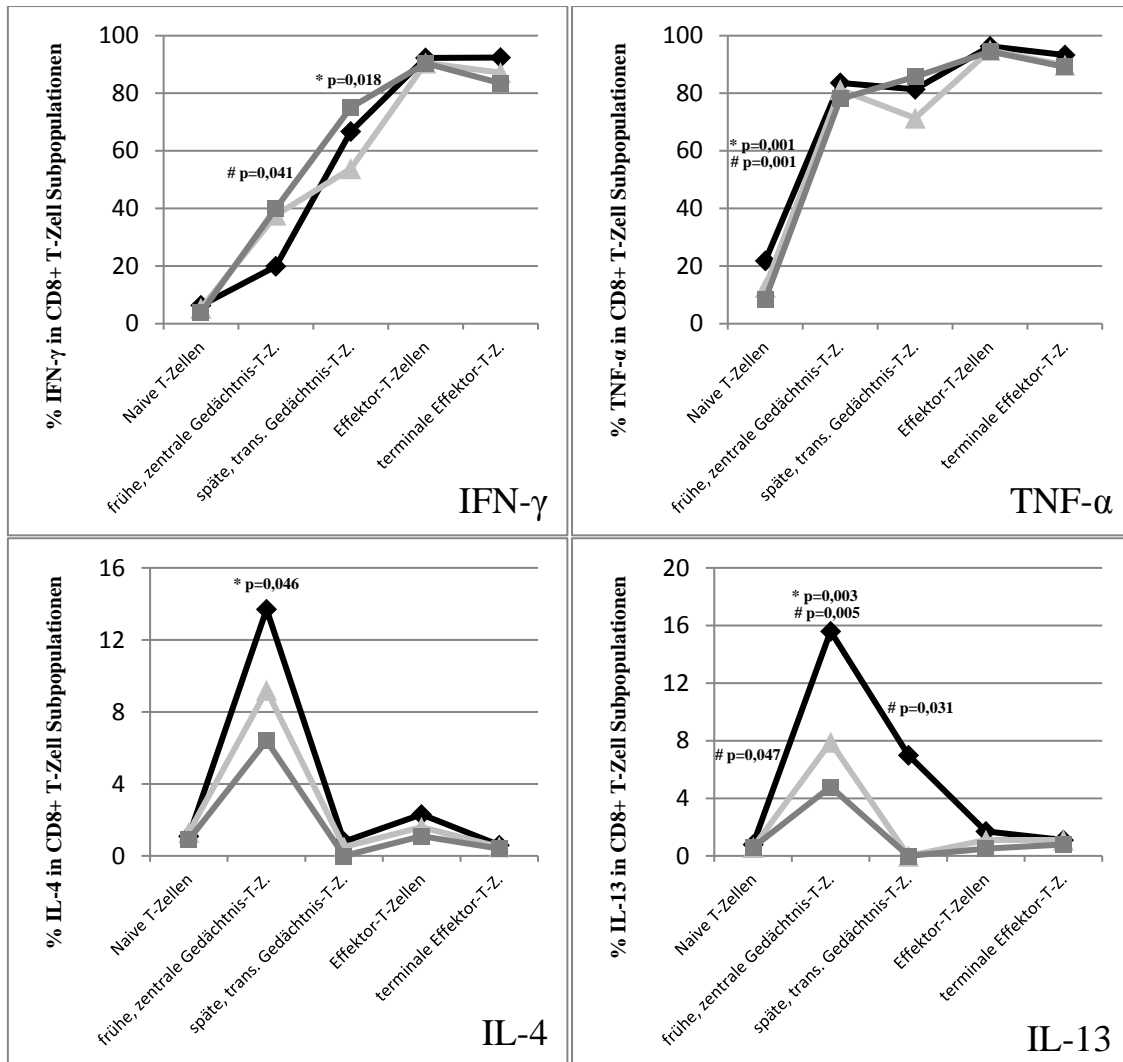




**Abbildung 21** Repräsentatives Beispiel der intrazellulären Zytokine der CD8 pos. T-Zellen von SSc-Patienten und gesunden Kontrollen.

Nach Gating der Lymphozyten wurde jeweils auf der Y-Achse CD8 aufgetragen und auf den X-Achsen das Zytokin. Die Zahlen in den rechten oberen Quadranten zeigen die CD8 und Zytokin doppelt positiven Zellen als Anteil der gesamten CD8+ T-Zellen.

**Abbildung 22 :Intrazelluläres IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 und IL-13 in verschiedenen Subpopulationen der CD8+ T-Zellen.**



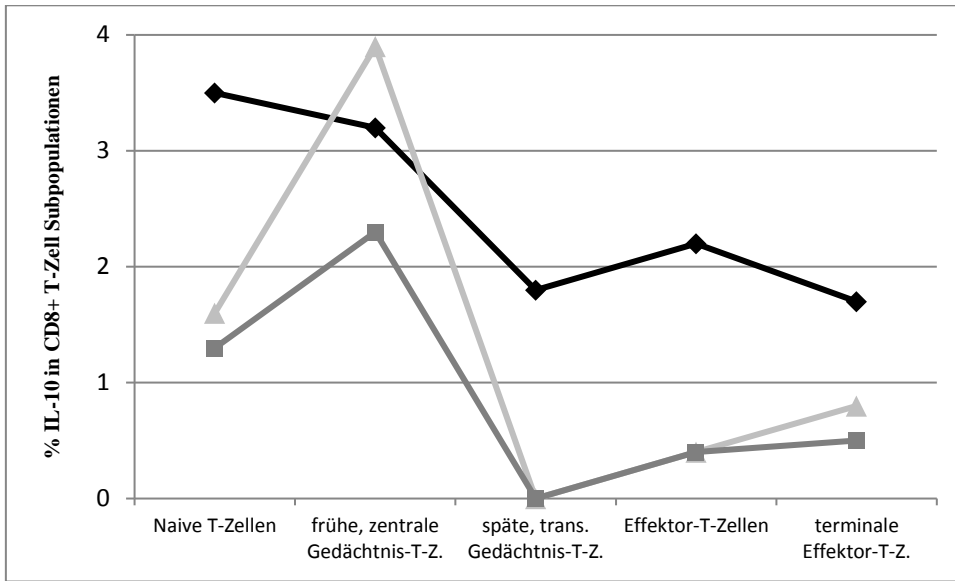
**Legende zu Abbildung 22:** ◆ dcSSc ▲ lcSSc ■ HC

Proportionen von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-13 und IL-4 positiven CD4+ T-Zell Subpopulationen in dcSSc- und lcSSc-Patienten sowie gesunden Kontrollen (HC). Die einzelnen Werte repräsentieren jeweils den Median.

\* steht für signifikante Unterschiede zwischen SSc und HC, # steht für signifikante Unterschiede zwischen dcSSc und HC.

Bezüglich der Proportionen von IL-10+ Zellen in den CD8+ T-Zell Subpopulationen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen SSc-Patienten und HC sowie zwischen lcSSc- und dcSSc-Patienten. Allerdings zeigt sich ein Trend zu gesteigerter IL-10 Produktion in T-Zell-Subgruppen von dcSSc-Patienten (siehe Abbildung 23).

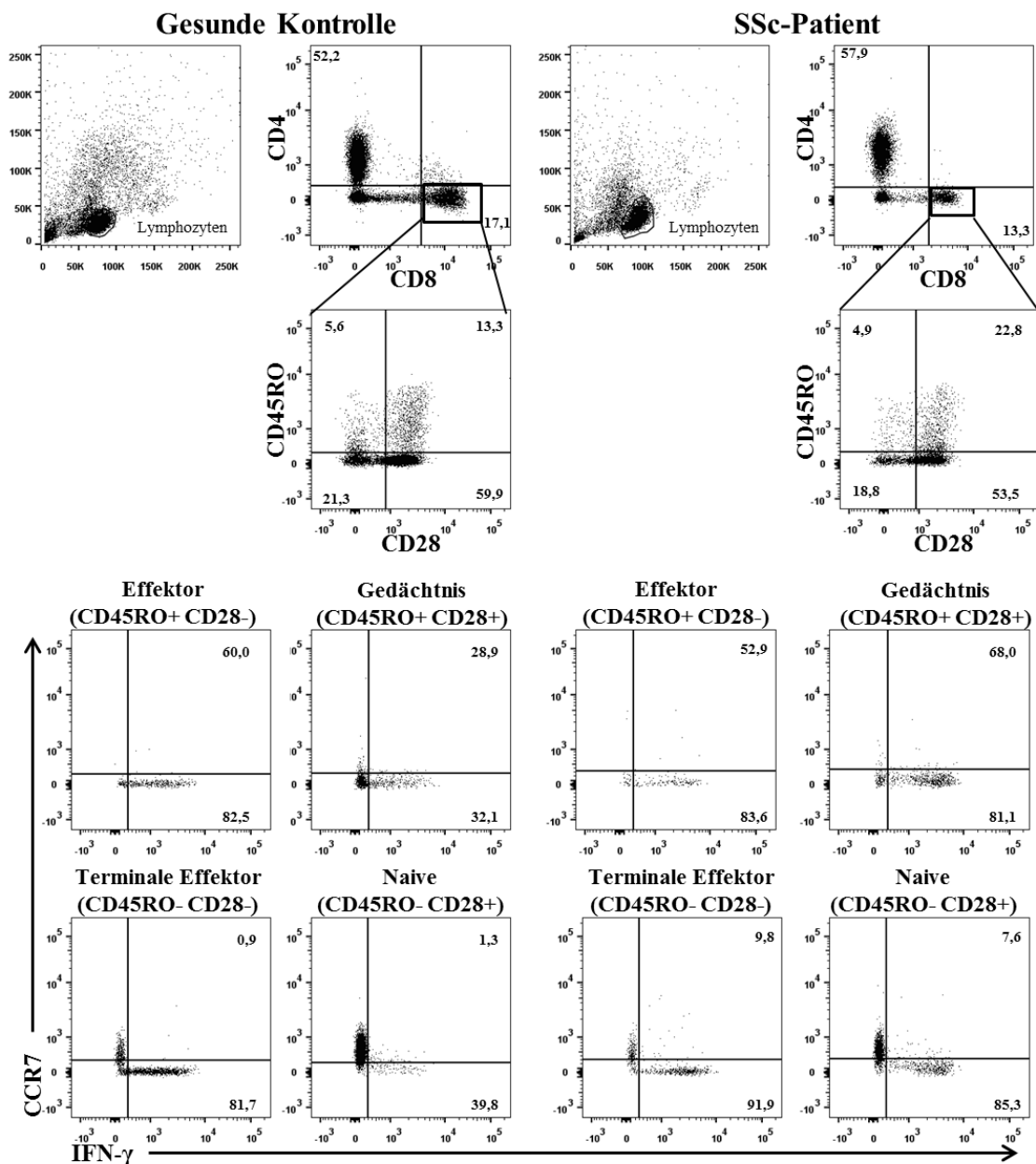
**Abbildung 23 Intrazelluläres IL-10 in verschiedenen CD8+ T-Zell Subpopulationen**



**Abbildung 23:** ◆ dcSSc ▲ lcSSc ■ HC

Proportionen von IL-10 positiven CD8+ T-Zell Subpopulationen in dcSSc- und lcSSc-Patienten sowie gesunden Kontrollen (HC). Die einzelnen Werte repräsentieren jeweils den Median.

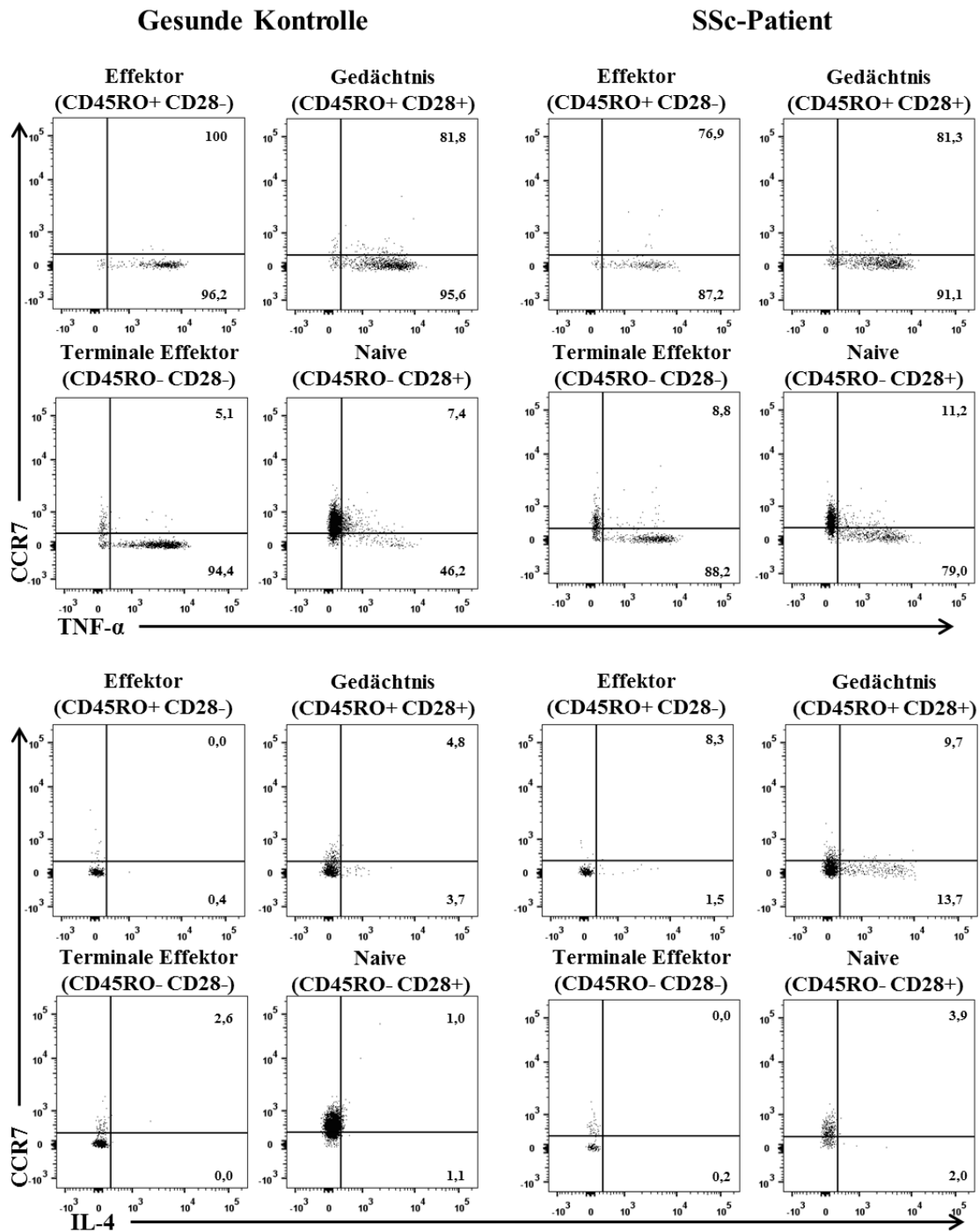
\* steht für signifikante Unterschiede zwischen lcSSc und dcSSc, # steht für signifikante Unterschiede zwischen dcSSc und HC.



**Abbildung 24** Repräsentatives Beispiel des Gatings der CD8+ Subpopulationen und deren IFN- $\gamma$  Zytokinproduktion anhand einer gesunden Kontrolle und eines SSc-Patienten.

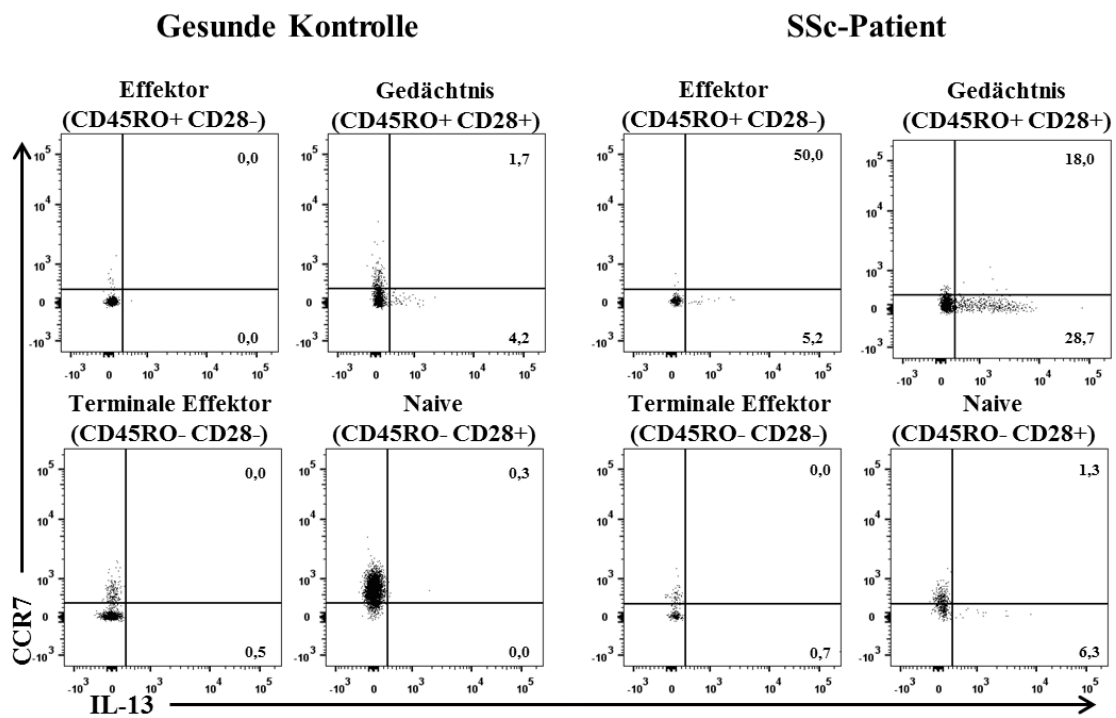
Nach Gating der Lymphozyten und CD8+ T-Zellen wurden die Effektor- (CD45RO+CD28-), Gedächtnis- (CD45RO+CD28+), „frühen“ Effektor- (CD45RO-CD28-) und naiven T-Zellen (CD45RO-CD28+) bestimmt. Die Zahlen in den Quadranten zeigen jeweils den Anteil an der übergeordneten Population.

Anschließend wurden in den jeweiligen Subpopulationen IFN- $\gamma$  + und CCR7+ Zellen identifiziert. Dort zeigen die Zahlen des rechten oberen Quadranten den Anteil der IFN- $\gamma$  und CCR7 doppelt pos. Zellen in allen CCR7+ Zellen dieser Population. Die Zahlen des rechten unteren Quadranten zeigen den Anteil der IFN- $\gamma$  pos., CCR7- Zellen in allen CCR7- Zellen dieser Population.



**Abbildung 25: Repräsentative Beispiele für TNF- $\alpha$  und IL-4 Zytokinproduktion anhand einer gesunden Kontrolle und eines SSc-Patienten.**

In den jeweilig aufgeführten Subpopulationen wurden TNF- $\alpha$  +, IL-4+ und CCR7+ Zellen identifiziert. Dort zeigen die Zahlen des rechten oberen Quadranten den Anteil der TNF- $\alpha$ + CCR7+ Zellen sowie den Anteil der IL-4+ CCR7+ Zellen in allen CCR7+ Zellen dieser Population. Die Zahlen des rechten unteren Quadranten zeigen den Anteil der TNF- $\alpha$ + oder IL-4+, CCR7- Zellen in allen CCR7- Zellen dieser Population.



**Abbildung 26: Repräsentatives Beispiel für die IL-13 Zytokinproduktion in Subpopulationen anhand einer gesunden Kontrolle und eines SSc-Patienten.**

In den jeweilig aufgeführten Subpopulationen wurde IL-13+ und CCR7+ Zellen identifiziert. Dort zeigen die Zahlen des rechten oberen Quadranten den Anteil der IL-13+ CCR7+ Zellen in allen CCR7+ Zellen dieser Population. Die Zahlen des rechten unteren Quadranten zeigen den Anteil der IL-13+ CCR7- Zellen in allen CCR7- Zellen dieser Population.

#### 3.4.4 Korrelationen zwischen Chemokinrezeptor Expression und intrazellulärer Zytokinproduktion der CD8+ T-Zellen

Erwartungsgemäß zeigte sich in gesunden Kontrollen eine positive Korrelation von CCR5 mit der IFN- $\gamma$  (R=0,444; p=0,016) und TNF- $\alpha$  Produktion (R=0,388; p=0,037) in CD8+ T-Zellen.

Eine signifikante negative Korrelation von CXCR3 und IL-13 Produktion (R=-0,384; p=0,048) sowie von CXCR3 und IL-4 Produktion (R=-0,386; p=0,038) in CD8+ T-Zellen konnte ebenfalls in gesunden Kontrollen gezeigt werden.

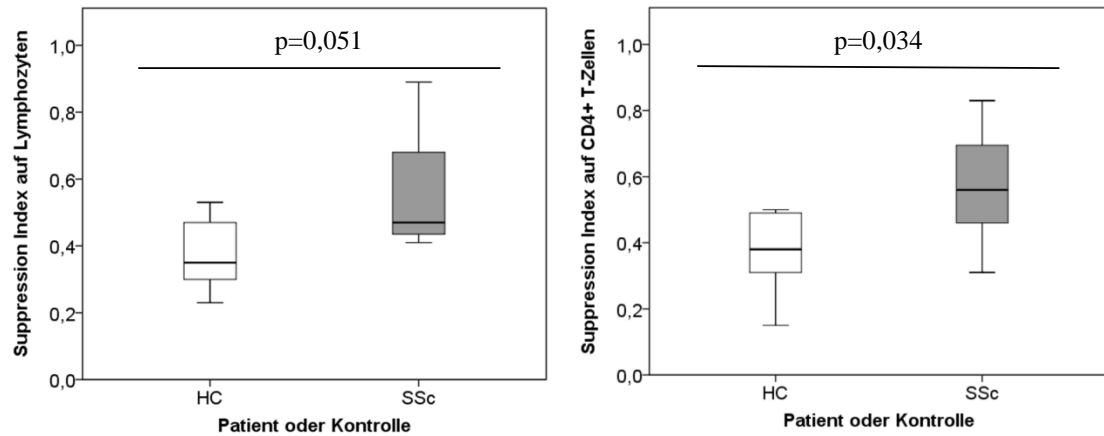
In CD8+ T-Zellen der dcSSc-Patienten zeigte sich bezüglich der Expression von CXCR3 eine positive Korrelation mit der Produktion von IFN- $\gamma$  (R=0,582, p=0,002) und IL-17 (R=0,492, p=0,012) und eine negative Korrelation mit der Produktion von IL-4 (R=-0,515; p=0,007).

Die Expression von CCR5 auf CD8+ T-Zellen der dcSSc-Patienten korrelierte positiv mit der Produktion von IFN- $\gamma$  (R=0,854; p=0,0001) und TNF- $\alpha$  (R=0,603, p=0,001).

Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Expression von CD161 und CCR6 auf CD8+ T-Zellen positiv mit der intrazellulären Produktion von IL-9 (R=0,523, p=0,009) und IL-17 (R=0,556, p=0,004) korreliert. Die Produktion von IL-17 und IL-9 in CD8+ T-Zellen korrelierte ebenfalls signifikant miteinander (R=0,491, p=0,015).

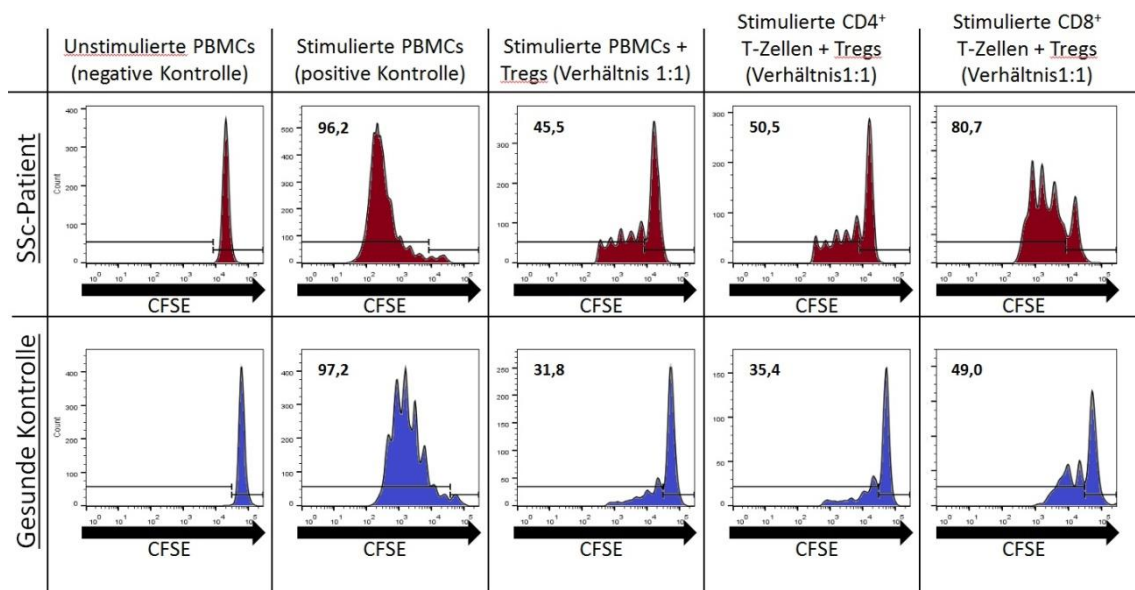
#### 3.5 Suppressionsassays

Betrachtet man die suppressive Aktivität der regulatorischen T-Zellen auf die Proliferation von Lymphozyten, CD4+ T-Zellen und CD8+ T-Zellen, so stellten wir eine signifikant erniedrigte suppressive Aktivität der Tregs und signifikant erhöhte Suppressionsindices in Bezug auf Lymphozyten (p=0,051) und CD4+ T-Zellen (p=0,035) in SSc-Patienten fest. Bezüglich der suppressiven Aktivität auf die Proliferation von CD8+ T-Zellen ergab sich, wie auch bei CD4+ T-Zellen und Lymphozyten ein Trend zu verminderter suppressiver Aktivität der Tregs von SSc-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen (siehe Abbildung 27 und Abbildung 28).



**Abbildung 27** Suppressionsindex auf Lymphozyten und CD4+ T-Zellen von gesunden Kontrollen (HC) und SSc-Patienten.

Es zeigt sich ein signifikant größerer Suppressionsindex (und somit verminderte suppressive Aktivität der Tregs) bei SSc-Patienten im Vergleich zu HC in Bezug auf die Proliferation von autologen Lymphozyten und CD4+ T-Zellen. Auf der Y-Achse ist der Suppressionsindex aufgetragen, auf der X-Achse die Gruppe der gesunden Kontrollen (HC) und der SSc-Patienten (SSc).



**Abbildung 28** Repräsentatives Beispiel eines Suppressionsassays eines SSc-Patienten und einer gesunden Kontrolle.

Ein repräsentatives Beispiel eines Suppressionsassays mit einem SSc-Patienten (rote Farbe) und einer gesunden Kontrolle (blaue Farbe). Auf der X-Achse ist die Intensität der CFSE-Färbung der Lymphozyten und CD4+- bzw. CD8+ T-Zellen zu sehen. Der Cut-off wurde an die negative Kontrolle angepasst. Die Zahlen in den Histogrammen repräsentieren die Prozentzahl der proliferierenden Zellen.



### 3.6 Zytokine im Serum

Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17 und IL-22 Spiegel im Serum von Patienten mit SSc, dcSSc, lcSSc und gesunden Kontrollen. Trends zu höheren IFN- $\gamma$  Spiegeln im Serum von SSc-Patienten konnten gefunden werden ( $p=0,053$ ) (siehe Tabelle 17).

**Tabelle 17 Serumzytokine von SSc-Patienten (n=23, davon n(lcSSc)=16 und n(dcSSc)=7) und gesunden Kontrollen (n=25)**

Zytokin	Systemische Sklerose (SSc)	Diffuse kutane Systemische Sklerose (dcSSc)	Limitiert kutane Systemische Sklerose (lcSSc)	p-Wert <sup>a</sup>	Gesunde Kontrollen (HC)	p Wert <sup>b</sup>	p Wert <sup>c</sup>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	4,4 $\pm$ 12,6 (0,0; 0 - 55,7)	3,0 $\pm$ 6,8 (0,0; 0 - 18,3)	5,0 $\pm$ 14,6 (0,0; 0 - 55,7)	0,769	0,73 $\pm$ 2,2 (0,0; 0 - 7,9)	0,340	0,503
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	63,7 $\pm$ 62,0 (68,6; 0 - 248,6)	46,2 $\pm$ 52,0 (24,7; 0 - 120,1)	71,4 $\pm$ 65,9 (68,6; 0 - 248,6)	0,413	32,4 $\pm$ 37,9 (24,7; 0 - 128,9)	0,053	0,624
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	97,7 $\pm$ 93,0 (111,0; 0 - 354,2)	93,6 $\pm$ 127,7 (52,2; 0 - 354,2)	99,3 $\pm$ 78,5 (114,8; 0 - 284,1)	0,492	57,4 $\pm$ 66,1 (32,1; 0 - 199,4)	0,138	0,721
<b>IL-2</b>	286,2 $\pm$ 189,3 (322,4; 0 - 524,0)	247,7 $\pm$ 193,9 (271,6; 0 - 450,5)	303,1 $\pm$ 191,1 (345,4; 0 - 524,0)	0,452	230,7 $\pm$ 189,0 (291,4; 0 - 575,1)	0,278	0,789
<b>IL-4</b>	53,2 $\pm$ 46,7 (70,7; 0 - 131,7)	49,3 $\pm$ 53,3 (41,7; 0 - 131,7)	54,9 $\pm$ 45,4 (71,6; 0 - 131,7)	0,820	32,4 $\pm$ 37,2 (0,0; 0 - 112,1)	0,070	0,447
<b>IL-5</b>	78,3 $\pm$ 73,5 (79,5; 0 - 205,5)	73,3 $\pm$ 80,6 (42,1; 0 - 205,5)	80,4 $\pm$ 72,8 (84,0; 0 - 193,4)	0,974	72,7 $\pm$ 66,1 (32,1; 0 - 229,3)	0,783	0,859
<b>IL-6</b>	0 $\pm$ 0 (0,0; 0 - 0)	0 $\pm$ 0 (0,0; 0 - 0)	0 $\pm$ 0 (0,0; 0 - 0)	1,0	0 $\pm$ 0 (0,0; 0 - 0)	1,0	1,0
<b>IL-9</b>	9,1 $\pm$ 16,0 (0,0; 0 - 62,0)	5,1 $\pm$ 9,9 (0,0; 0 - 25,9)	11,0 $\pm$ 18,0 (0,0; 0 - 62,0)	0,579	7,5 $\pm$ 17,8 (0,0; 0 - 79,9)	0,353	0,929
<b>IL-10</b>	15,9 $\pm$ 22,0 (7,5; 0 - 77,2)	9,0 $\pm$ 12,0 (4,8; 0 - 32,7)	19,0 $\pm$ 24,9 (10,1; 0 - 77,2)	0,579	9,9 $\pm$ 14,5 (0,0; 0 - 54,0)	0,408	0,859
<b>IL-12</b>	32,5 $\pm$ 80,0 (0,0; 0 - 318,3)	11,6 $\pm$ 18,9 (0,0; 0 - 40,9)	41,7 $\pm$ 94,6 (1,3; 0 - 318,3)	0,720	5,4 $\pm$ 11,5 (0,0; 0 - 44,2)	0,089	0,447
<b>IL-13</b>	120,9 $\pm$ 70,1 (139,3; 0 - 232,6)	109,1 71,4 (131,0; 27,0 - 193,8)	126,0 $\pm$ 71,2 (142,0; 0 - 232,6)	0,624	80,4 $\pm$ 73,3 (39,4; 0 - 198,3)	0,061	0,302
<b>IL-17</b>	85,1 $\pm$ 97,8 (79,8; 0 - 349,3)	71,7 $\pm$ 109,9 (9,0; 0 - 298,1)	91,0 $\pm$ 95,2 (93,6; 0 - 349,3)	0,579	43,4 $\pm$ 65,0 (0,0; 0 - 212,5)	0,182	0,688
<b>IL-22</b>	11,6 $\pm$ 32,8 (0,0; 0 - 126,1)	13,1 $\pm$ 34,8 (0,0; 0 - 91,9)	10,9 $\pm$ 33,0 (0,0; 0 - 126,1)	1,0	9,5 $\pm$ 33,2 (0,0; 0 - 132,6)	0,627	0,859

**Legende zu Tabelle 17:**

Serumzytokine sind in pg/ml angegeben. Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben (Median; Minimum - Maximum).

<sup>a</sup>Vergleich zwischen lcSSc und dcSSc. <sup>b</sup>Vergleich zwischen SSc und HC. <sup>c</sup>Vergleich zwischen dcSSc und HC

Serum IL-17 Spiegel korrelierten positiv mit IFN- $\gamma$ - (R=0,897, p=0,0001), TNF- $\alpha$  (R=0,502, p=0,015), IL-4 (R=0,482, p=0,020) und IL-13 Spiegeln (R=0,804, p=0,0001) bei Patienten mit SSc.

Auch bei den gesunden Kontrollen konnten signifikante positive Korrelationen von Serum-IFN- $\gamma$  (R=0,758, p=0,0001), IL-13 (R=0,810, p=0,0001), IL-4 (R=0,841, p=0,0001) zu Serum-IL17 gezeigt werden. Eine Korrelation zu TNF- $\alpha$  ergab sich anders als bei den SSc-Patienten nicht.

Korrelationen zwischen Serum-Zytokinspiegeln von TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-13 und IL-4 und der intrazellulären Produktion dieser Zytokine in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen ergaben sich bei SSc-Patienten und gesunden Kontrollen nicht.

## **4 Diskussion**

T-Zellen sind ein wichtiger Bestandteil der erworbenen Immunität und spielen eine entscheidende Rolle in der Entstehung und dem Fortschreiten von Autoimmunerkrankungen. Wie oben erläutert, könnten auch in der Pathogenese der SSc T-Zellen entscheidend beteiligt sein.

### **4.1 Größeres inflammatorisches Potential der CD4+ T-Zellen bei Patienten mit SSc**

Proportionen der CD4+ T-Zellen zeigten sich in unserem Patientenkollektiv bei dcSSc-Patienten im Vergleich zu lcSSc-Patienten signifikant erniedrigt. Insgesamt zeigte sich auch bei dcSSc Patienten eine relative Lymphopenie, die am ehesten mit dem vermehrten Einsatz von immunsuppressiven Medikamenten wie z.B. Glucokortikoiden, Methotrexat und Azathioprin erklärt werden kann.[103] Allerdings ist auch zum Beispiel beim systemischen Lupus erythematoses, einer anderen Kollagenose, eine Assoziation von Lymphopenie und erhöhter Krankheitsaktivität beschrieben.[104] Bei der SSc gibt es aktuell keine Daten zu Korrelation von Lymphopenie und Krankheitsaktivität.

Es zeigte sich, dass bei Patienten mit SSc größere Proportionen von Gedächtnis-T-Zellen vorhanden sind, als bei gesunden Kontrollen. Gerade bei Patienten mit dcSSc zeigten sich signifikant größere Proportionen von CCR7 negativen, späten, transitionalen Gedächtnis- und CCR7+ Effektor-T-Zellen als bei gesunden Kontrollen. Gleichzeitig konnten wir zeigen, dass naive CD4+ T-Zellen bei SSc-Patienten in geringerem Maße als bei gesunden Kontrollen vorhanden sind. Passend zu diesem Aspekt waren auch CD31+TCR $\alpha/\beta$ + T-Zellen vor allem bei Patienten mit diffuser SSc in geringerem Maße im peripheren Blut zu finden. Diese Zellpopulation bildet T-Zellen ab, die gerade neu aus dem Thymus emigriert sind.[102]

Eine Erklärung dafür könnte sein, dass am ehesten durch immer wiederkehrende entzündliche Schübe der Erkrankung oder persistierende Inflammation das Immunsystem in einem Status größerer Inflammation oder Inflammationsbereitschaft steht. Dies könnte durch vermehrte Stimulation durch bisher unbekannte Antigene bedingt sein und dadurch eine Differenzierung von naiven CD4+ T-Zellen forcieren und

T-Zellen vermehrt in entzündetes Gewebe migrieren lassen.[105, 106]. Diese These wird unter anderem dadurch unterstützt, dass in untersuchten Hautbiopsien von SSc-Patienten in größerem Maße CD45RO+ T-Zellen zu finden waren.[107] Möglich wäre auch ein verminderter Ausstoß von CD31+TCR $\alpha/\beta$ + T-Zellen aus dem Thymus.

Ebenfalls kongruent zu diesen Beobachtungen zeigte sich hier, dass Patienten mit Organbeteiligung und somit meist einem schwerwiegenderen klinischen Phänotyp im Rahmen ihrer SSc größere Mengen an Effektor-T-Zellen und geringere Mengen an naiven T-Zellen im peripheren Blut trugen. Daten zeigen, dass bei ANCA-positiven Vaskulitiden, wie z.B. der Wegener Granulomatose, vermehrt vorhandene CD4+ Effektor-T-Zellen eine Rolle in der Krankheitsentstehung spielen.[108] Bei der SSc ist dies bis dato noch nicht beschrieben worden. Allerdings wurde bereits vermutet, dass CD4+ Effektor-T-Zellen eine Rolle bei früh auftretenden vaskulären Schäden in der Entstehung der SSc spielen könnten.[109]

Durch die hier präsentierten Daten lässt sich vermuten, dass gerade die späten, transitionalen Gedächtnis-T-Zellen einen signifikanten Anteil an der Inflammation in SSc Patienten zu haben scheinen. Große Mengen an proinflammatorischem TNF- $\alpha$  werden durch diese Population nach unspezifischer Stimulation produziert. Das zeigt das große inflammatorische Potential dieser Population. Nicht nur bei SSc-Patienten, sondern auch in gesunden Kontrollen zeigten diese Zellen eine hohe TNF- $\alpha$  Produktion. Allerdings konnten signifikant größere Proportionen dieser Population in SSc-Patienten gefunden werden.

Auch CCR7 positive und negative CD4+ naive T-Zellen zeigten signifikant größere Mengen an produziertem TNF- $\alpha$  nach unspezifischer Stimulation in SSc-Patienten als in gesunden Kontrollen. Im Serum waren bereits größere Mengen an TNF- $\alpha$  bei SSc-Patienten im Vergleich zu Gesunden gefunden worden. Außerdem zeigte sich eine Assoziation von erhöhten TNF- $\alpha$  Spiegeln im Serum und Lungenfibrose.[110, 111]

Gerade die CCR7 negativen naiven und späten transitionalen Gedächtnis-T-Zellen (ebenfalls CCR7 negativ) waren bisher nicht als mitwirkende T-Zell Populationen in Inflammation bei SSc beschrieben worden. Im Laufe ihrer Differenzierung und Ausreifung verlieren T-Zellen normalerweise die Fähigkeit, TNF- $\alpha$  zu produzieren[96], sodass es erstaunlich ist, dass diese späte Gedächtniszellpopulation bei SSc-Patienten

noch einen so großen Anteil an der TNF- $\alpha$  Produktion zu haben scheint.

Beide Populationen zeichnet unter anderem das Fehlen von CCR7 aus.

In Mäusen konnte beschrieben werden, dass Fehlen von CCR7 ein vermehrtes Auftreten von Autoimmunerkrankungen bedingt.[112] Wie oben bereits beschrieben, ist ja die Population der späten, transitionalen Gedächtnis-T-Zellen vermehrt bei SSc-Patienten zu finden.

Außerdem konnten *Jones et. al.* [113] zeigen, dass es bei Lymphopenien bei Autoimmunerkrankungen zu einer vermehrten Entstehung von CCR7- Gedächtnis-T-Zell-Populationen durch oligoklonale Proliferation dieser Zellen kommt. Diesen Zellen wurde schon dort ein großes inflammatorisches und proliferatives Potential zugeschrieben. Es wurde postuliert, dass diese Population ein vermehrtes Auftreten von Autoimmunität bedingen könnte.

Betrachtet man in unseren Daten die TNF- $\alpha$  Produktion in der Gesamtheit der CD4+ T-Zellen, zeigen sich bei Patienten mit dem schwereren Phänotyp der Erkrankung, also der dcSSc, signifikant größere Mengen dieses inflammatorischen Zytokins als in gesunden Kontrollen. Dies zeigt sich auch in fast allen untersuchten T-Zell-Subpopulationen, wie Abbildung 8 veranschaulicht. Wie oben bereits erwähnt, korrelierten erhöhte TNF- $\alpha$  Spiegel im Serum von SSc-Patienten mit dem Auftreten einer Lungenfibrose.[110]

Ein weiteres typisches Th1-Zytokin ist IFN- $\gamma$ . [114] In den CD4+ T-Zellen unserer Populationen zeigte sich überraschenderweise im Vergleich zu TNF- $\alpha$  keine vermehrte Produktion von IFN- $\gamma$  nach unspezifischer Stimulation.

Interessanterweise produzierte die große Population der CCR7 negativen, späten, transitionalen Gedächtnis-T-Zellen bei Patienten mit dcSSc sogar weniger IFN- $\gamma$  als bei gesunden Kontrollen. Dies steht im Kontrast zu den erhöhten Proportionen bezüglich der TNF- $\alpha$  Produktion, wenn man bedenkt, dass beide Zytokine als proinflammatorische Th1 Mediatoren gelten. Im Serum zeigten sich allerdings größere Mengen von IFN- $\gamma$  in den SSc-Patienten als in gesunden Kontrollen (Tabelle 17).

Bereits in der Vergangenheit wurde *in vitro* gezeigt, dass IFN- $\gamma$  antifibrotische Effekte auf Fibroblasten von SSc-Patienten in der Zellkultur hat.[115] Diese Tatsache machte man sich in den 90er Jahren zu Nutze und versuchte, die SSc mit rekombinantem

Interferon-gamma zu therapieren: Es zeigte sich ein mäßiges Ansprechen einiger Krankheitsaktivitätsmarker.[116] Einen durchschlagenden Erfolg brachte dies allerdings nicht. Weiterhin unbestritten sind allerdings die antifibrotischen Effekte des IFN- $\gamma$  auf Fibroblasten in in-vitro Experimenten.

Die hier gezeigten tendenziell niedrigeren IFN- $\gamma$  Produktionen in CD4+ T-Zellen könnten somit über diesen direkten Einfluss auf Fibroblasten eher zum Fortschreiten der Fibrose führen.

Nicht konkordant dazu zeigten sich die gemessenen Serumspiegel von IFN- $\gamma$  bei SSc-Patienten tendenziell erhöht. IFN- $\gamma$  wird allerdings nicht ausschließlich durch CD4+ und CD8+ T-Zellen, sondern z.B. auch von NK- und NK-T-Zellen produziert. Gegebenenfalls führt der Status größerer Inflammation in SSc-Patienten auch zu einer Aktivierung von diesen, hier nicht untersuchten Zellen, und somit auch zu einer vermehrten IFN- $\gamma$  Ausschüttung in die Blutbahn, was die tendenziell erhöhten Serumspiegel erklären könnte.

Interessanterweise zeigten sich in den CD4+ T-Zellen auch die intrazellulären Proportionen von IL-1 $\beta$ , IL-9 und TGF- $\beta$  bei Patienten mit dcSSc im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht.

Bezüglich IL-1 $\beta$ , einem ebenfalls proinflammatorischen Zytokin, wurde bereits in den 90er Jahren postuliert, dass durch erhöhte IL-1 Rezeptordichten auf Fibroblasten bei SSc-Patienten eine profibrotische Funktion dieses Zytokins bei der SSc vorhanden sein könnte.[117] IL-1 $\beta$  wurde in den CD4+ T-Zellen in unserem Kollektiv allerdings nur in sehr geringem Ausmaß produziert, sodass eine Identifizierung der Subpopulationen der T-Zellen, die dieses Zytokin produzieren, nicht möglich war. Ebenfalls sind Monozyten die Hauptproduzenten dieses Zytokins, sodass große Mengen in T-Zellen nicht zu erwarten waren. Somit ist es sehr fraglich, ob der geringe Anteil an IL-1 $\beta$  aus T-Zellen im Vergleich zu anderen IL-1 produzierenden PBMCs einen Effekt hat. Im Serum der Patienten zeigten sich hier auch keine signifikanten Unterschiede von IL-1 $\beta$  Spiegeln im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

Interleukin-9 wurde hier in den CD4+ T-Zellen, die als Hauptproduzenten dieses inflammatorischen Zytokins gelten, in unserer Population sowohl in den SSc-Patienten, als auch in den gesunden Kontrollen nur sehr wenig produziert. Anders als im Serum

waren die geringen Mengen dieses Zytokins in den CD4+ T-Zellen der SSc-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden allerdings signifikant vermehrt zu finden.

*Yanaba et al.*[118] zeigten allerdings im Gegensatz zu unseren Daten, dass im Serum von SSc-Patienten höhere Spiegel an IL-9 zu finden waren. Es ergab sich eine Assoziation von geringer ausgeprägter und weniger häufiger Lungenfibrose in den SSc-Patienten mit hohen IL-9 Spiegeln, was gegebenenfalls einen protektiven Effekt dieses Zytokins vor ausgeprägtem Organbefall im Rahmen der SSc vermuten lässt. Andererseits lassen die erhöhten Spiegel und die durch uns gezeigte stärkere Fähigkeit der T-Zellen, IL-9 zu produzieren, eher eine Beteiligung dieses Zytokins in der Pathogenese der Erkrankung vermuten.[119]

TGF- $\beta$  wird schon seit längerem große Beachtung geschenkt, da dieses Zytokin fähig ist, die Synthese der Extrazellulärmatrix über die Stimulation der Fibroblasten zu steuern. Sicher ist mittlerweile, dass dieses Zytokin eine Schlüsselrolle in der Pathogenese und dem Fortschreiten der Fibrose handelt.[120]

In dieser Arbeit lag der Fokus zwar nicht auf der Untersuchung von TGF- $\beta$ , allerdings zeigten sich in CD4+ T-Zellen signifikant größere Proportionen von intrazellulärem TGF- $\beta$  bei SSc-Patienten. Genauso wie bei den vorher beschriebenen Zytokinen IL-1 und IL-9 konnten aber nur sehr geringe Mengen in den stimulierten Zellen identifiziert werden, sodass eine genauere Unterscheidung der Herkunft nicht möglich war.

CXCR3 wurde in signifikant geringerem Maße auf CD4+ T-Zellen von dcSSc-Patienten gefunden. Bisher wurde beschrieben, dass immunsuppressive Therapien die Expression dieses Th1 Markers verringern.[121] Da Patienten mit dcSSc häufig in größerem Maße immunsuppressiv therapiert werden (in diesem Fall mit Glukokortikoiden, Methotrexat, Azathioprin und Cyclophosphamid), könnte das dieses Ergebnis erklären.

Eine weitere Erklärung hierfür könnte sein, dass zu Beginn der Hautfibrosierung vor allem Th1 dominante Immunantworten zur Beschleunigung der Inflammation und zum Fortschreiten des Krankheitsbildes beitragen.[69] Die Th1 Zellen migrieren in diesem Rahmen vermutlich vermehrt an den Ort der Entzündung und verschwinden häufiger aus der Zirkulation im peripheren Blut.

Allerdings unterscheidet sich die Expression von CCR5, ebenfalls einem Marker für Th1, auf CD4+ T-Zellen bei Patienten mit SSc nicht mit gesunden Kontrollen. Das steht

natürlich im Gegensatz zu den Erläuterungen der verminderten CXCR3 Expression im peripheren Blut.

In der Literatur gibt es bis dato wenig Daten zu CCR5-Expression auf T-Zellen bei SSc-Patienten, allerdings wurde von *Boin et al.* beschrieben, dass geringere CCR5-Expression auf T-Zellen bei SSc-Patienten mit vermehrter Lungenbeteiligung der Erkrankung einhergeht.[122]

Somit stehen die hier beschriebenen Ergebnisse bezüglich der CCR5-Expression im Kontrast zur bisherigen Literatur. Gegebenenfalls migrieren CXCR3 positive Th1-Zellen selektiver an den Ort der Inflammation, als CCR5+ Th1-Zellen, sodass diese vermehrt in der Blutbahn zurückbleiben. Andererseits könnte auch der fehlende Einfluss immunsuppressiver Therapien auf die Expression von CCR5, im Gegensatz zu CXCR3 (s.o.), als Ursache in Frage kommen.

#### 4.2 Beitrag der CD8+ T-Zellen zur Inflammation und Fibrose bei SSc

Wir konnten ebenfalls zeigen, dass CD8+ T-Zellen eine wichtige Quelle für Th2 typische Zytokine bei Patienten mit SSc darstellen. Vor allem CD8+ Gedächtnis-T-Zellen tragen durch Produktion von v.a. Th2 Zytokinen wie z.B. IL-13 und IL-4 dazu bei.

Signifikant größere Mengen an IL-13 wurden durch die Gesamtheit der CD8+ T-Zellen und im speziellen den CD8+ Gedächtnis-T-Zellen bei Patienten mit dcSSc im Vergleich zu gesunden Kontrollen produziert. Bereits *Fuschiotti et al*[123],[124] zeigten, dass im peripheren Blut zirkulierende CD8+ T-Zellen vermehrt IL-13 produzieren und durch hohe Expression von Proteinen, die das Migrieren in die Haut ermöglichen, vermehrt in die Haut einwandern. Dort induzieren sie einen profibrotischen Fibroblasten. Es konnten in der Haut der SSc-Patienten große Mengen an IL-13 positiven T-Zellen nachgewiesen werden.[123]

In unseren Ergebnissen bestätigt sich auch bezüglich IL-13 der Trend, dass Patienten mit der diffusen Form der SSc in CD8+ T-Zellen größere Mengen dieses Zytokins produzieren können als lcSSc Patienten oder gesunde Kontrollen. Da in diesen Patienten die Fibrose deutlich ausgeprägter verläuft als in den lcSSc Patienten passen diese Daten gut zu dem Verdacht der profibrotischen Wirkungen des Interleukins-13[123, 125].



Im Serum von SSc-Patienten zeigten sich Trends zu größeren Mengen von IL-13 gegenüber gesunden Kontrollen. Die Unterschiede waren allerdings knapp nicht signifikant.

Außerdem zeigte sich, dass IL-4 ebenso wie IL-13 durch CD8+ Gedächtnis-T-Zellen bei Patienten mit dcSSc in signifikant größerem Maße als bei gesunden Kontrollen produziert wird. Interleukin 4 ist ebenso wie IL-13 ein Th2-Zytokin, was hauptsächlich regulatorische Aufgaben in einer Immunantwort übernimmt. Die Rolle bei der SSc wird bis dato als unklar bzw. unübersichtlich beschrieben.[126]

Bereits in den 90er Jahren wurden allerdings in immunhistochemischen Untersuchungen der läsionalen Haut bei SSc-Patienten größere Mengen von IL-4 gefunden.[127]

Außerdem gibt es bereits Daten, die einen profibrotischen Effekt von IL-4 durch Stimulation von Fibroblasten[128] und direkte Stimulation der Kollagenbiosynthese zeigen.[129]

Dass die vermehrte Produktion von IL-4 aus differenzierten CD8+ T-Zellen zu diesen Effekten beitragen könnte, liegt nahe. Auch im Serum zeigen sich bei SSc-Patienten Trends zu höheren Spiegeln dieses Zytokins. Signifikant erhöht gegenüber gesunden Kontrollen waren diese allerdings nicht (Tabelle 17).

Ebenfalls von CD8+ T-Zellen signifikant mehr produziert wird intrazelluläres TGF- $\beta$ , welches ebenfalls zu den Th2-Zytokinen gehört. Genauso wie TGF- $\beta$  in CD4+ T-Zellen waren auch hier nur sehr geringe Mengen intrazellulär darstellbar, sodass eine Differenzierung in Subpopulationen, die dieses Zytokin produzieren, nicht möglich war.

Die starke Korrelation zwischen der intrazellulären Produktion von Th2 Zytokinen in CD8+ T-Zellen bei Patienten mit SSc lässt einen synergistischen Effekt dieser Zytokine für die Inflammation und ggf. die Fibrose bei der SSc vermuten. Einige typische Th1 Zytokine korrelierten ebenfalls positiv untereinander.

Es zeigte sich eine erwartete negative Korrelation von den gerade beschriebenen Th2 Zytokinen mit Chemokinrezeptoren für Th1-Antworten, wie z.B. CXCR3, CCR5 und CCR6. Dieses impliziert eine zweigetrennte T-Zell-Immunantwort bei der SSc.

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass in der Haut von SSc-Patienten vermehrt

Liganden verschiedener Chemokinrezeptoren zu finden waren.[130] Dadurch werden im Blut zirkulierende Zellen vermehrt an den Ort der Inflammation geleitet. CXCR3 auf CD8 positiven T-Zellen ist zum Beispiel wichtig für die Migration in das Gewebe, um dort virusinfizierte Zellen zu zerstören.[131]

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass bei der Graft-versus-Host disease in Mäusen CXCR3 wichtig für die Migration autoreaktiver CD8+ T-Zellen ist.[132] Die GVHD als Krankheitsbild zeigt im klinischen Phänotyp einige Gemeinsamkeiten mit der Sklerodermie und wird deshalb oft als vergleichbare Krankheit in Studien verwendet. Gerade die sklerodermiformen Hautveränderungen gleichen häufig sehr stark denen der SSc.

Man könnte nun spekulieren, dass das verminderte Vorhandensein von CXCR3 auf peripheren CD8+ T-Zellen durch vermehrte Migration der CXCR3-exprimierenden Zellen in entzündete Haut bei den SSc-Patienten bedingt ist. Dort tragen die migrierten Zellen dann eventuell zur Entzündung und dem Fortschreiten der Fibrose bei.

Außerdem zeigte sich, dass bei SSc-Patienten die Expression von CD161 und CCR6 auf CD8+ T-Zellen mit einer höheren intrazellulären Produktion von IL-17 und IL-9 assoziiert ist. Studien über Th9-Zellen in Autoimmunerkrankungen zeigten, dass Th2, Th17 und Th9 Antworten verknüpft zu sein scheinen[133]. Diese Beobachtungen stützen unsere Daten bzgl. der Korrelation von CCR6, CD161, IL-17 und IL-9 in CD8+ T-Zellen bei der SSc.

*Yanaba et al.* beschrieben 2011 erhöhte Serum IL-9 Spiegel bei Patienten mit SSc im Vergleich zu einem gesunden Kollektiv[118]. Unsere Daten zeigen keine erhöhten Serumspiegel von IL-9, jedoch Trends zu vermehrter intrazellulärer Produktion in CD8+ T-Zellen von SSc-Patienten.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass CD8+ Gedächtnis-T-Zellen ein potenter Produzent von TNF- $\alpha$  sind. Bei SSc-Patienten scheint bei fortschreitendem Alter die TNF- $\alpha$  Produktion gesteigert zu sein. Eine Assoziation von TNF- $\alpha$  und T-Zell Immunoseneszenz wurde unter anderem von *Macaulay et al.* beschrieben[134].

Interessanterweise zeigte sich hier, dass CD8+ T-Zellen in geringem Maße bei SSc-Patienten auch zur Produktion von IL-10 beitragen. IL-10 ist ein wichtiges

regulatorisches Zytokin während Infektionen und Entzündungen. Bei SSc-Patienten zeigten sich signifikant größere Proportionen von intrazellulärem IL-10 in naiven CD8+ T-Zellen als bei HC.

Daten zeigen beispielsweise auch, dass die IL-10 Produktion durch CD8+ Effektor-T-Zellen das Fortschreiten von GVHD und somit auch von sklerodermiformen Hautveränderungen in Mausmodellen supprimiert.[135]

Man kann spekulieren, dass durch größere Inflammation bei den Patienten mit SSc eben auch größere, aber vielleicht nicht ausreichende suppressive Mechanismen entstehen.

### 4.3 Die Rolle der Th-17 Zellen

Nachdem vor einigen Jahren das Dogma, dass Autoimmunreaktionen entweder Th1 oder Th2 gesteuert ablaufen, durch die Entdeckung weiterer Subpopulationen der T-Zellen, wie z.B. der Th-17 Zellen relativiert wurde, wurde schnell diskutiert, dass bei anderen Autoimmunerkrankungen wie z.B. chronisch entzündlichen Darmerkrankungen[136] und rheumatoider Arthritis[137] Th-17 eine wichtige Rolle spielen.

Th-17 Zellen zeichnen sich unter anderem durch die Expression des Chemokinrezeptors 6 (CCR6) aus.[83, 138] CCL-20 als Ligand zu diesem Rezeptor wird hauptsächlich durch Epithelien sezerniert und führt zur Rekrutierung von Th-17 Zellen zum Fokus der Inflammation.[83]

Unsere Daten zeigen, dass CD4+ T-Zellen bei Patienten mit SSc in größerem Maße CCR6 exprimieren. Interessanterweise betrifft dies vor allem T-Zellen von Patienten mit einer diffusen Form der SSc und somit Patienten mit einem schwereren Phänotyp. Passend zu diesem Ergebnis zeigt sich ebenfalls in unseren Daten, dass die Expression von CCR6 mit einer Organbeteiligung der SSc positiv signifikant korreliert.

Ein weiteres Kriterium, welches Th-17 Zellen definiert, ist die Produktion von IL-17.[83]

Unsere Daten zeigen, dass Patienten mit der diffusen Form der SSc größere Proportionen an CD4+ und CD4+CCR6+ T-Zellen besitzen, die nach Stimulation IL-17 produzieren. Außerdem zeigte sich, dass ein geringeres Alter der Patienten sowie eine kürzere Krankheitsdauer mit dem vermehrten Auftreten von Th-17 Markern assoziiert ist. Dies könnte die Wichtigkeit der Th-17 Zellen in den frühen Stadien der Erkrankung implizieren. Betrachtet man die Population der Scl-70 positiven Patienten, zeigen sich klare, jedoch nicht signifikante Trends zu vermehrter IL-17 Produktion in diesen Patienten. Scl-70 Autoantikörper sind sehr spezifisch für das Vorhandensein einer diffusen Form der SSc.

Bereits *Kurasawa et al.* beschrieben eine erhöhte Produktion von Interleukin 17 durch T-Zellen aus dem peripheren Blut und aus der Haut bei Patienten mit SSc.[139] *Fenoglio et al.* beschrieben, ebenfalls kongruent zu unseren Ergebnissen, eine erhöhte Produktion von IL-17 durch T-Zellen nach Stimulation.[140]

Überraschenderweise zeigten sich in unseren Ergebnissen im Gegensatz zu anderen

Studien wie zum Beispiel von *Murata et al.*[141] keine erhöhten IL-17 Spiegel im Serum bei SSc-Patienten. Auch andere IL-17 assoziierte Zytokine, wie z.B. IL-22, konnten nicht in erhöhtem Maße im Serum von SSc-Patienten gefunden werden. Dies steht ebenfalls in Kontrast zu den oben diskutierten Ergebnissen, dass IL-17 vermehrt durch T-Zellen produziert wird. Allerdings wurde hier ja die Fähigkeit der T-Zellen untersucht, durch Stimulation IL-17 zu produzieren. Es ist anzunehmen, dass in vivo diese Stimulation in der Haut bzw. den betroffenen Organen erfolgt, in die die Th17 Zellen migrieren.

Außerdem wurde bereits gezeigt, dass in der Haut, also dem Ort der Entzündung eine vermehrte Anzahl an Th-17 Zellen gefunden werden konnte.[142] Dies bestätigt, dass Serum IL-17 Spiegel nicht der optimale Messparameter für Inflammation bei der SSc sind.

Einen weiteren Th-17 Marker stellt CD161 dar. *Cosmi et al.* zeigten, dass Th17 aus einer Vorläuferpopulation hervorgehen, die CD161 exprimiert und durch IL-23 und IL-1 $\beta$  in Th17 differenziert werden.[143]

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass CD161+CD4+ T-Zellen in größerem Maße bei Patienten mit SSc zu finden sind und dass dies mit der Anzahl IL-17 produzierender T-Zellen, die ebenfalls noch CCR6 exprimieren, korreliert.[144]

Unsere Daten zeigen einen Trend zu mehr CCR6 und CD161 doppelt positiven T-Zellen bei SSc-Patienten. Eine Korrelation dieser Population mit der Produktion von Interleukin 17, wie sie durch *Truchetet et al.*[144] beschrieben wurde konnten wir allerdings nicht nachvollziehen.

#### 4.4 Die Rolle der regulatorischen T-Zellen

Regulatorische T-Zellen wurden in dieser Arbeit als CD4+CD25+CD127- und FoxP3+ T-Zellen definiert (siehe Kapitel 1.3.2.2).

Genauso wie Th-17 Zellen kommen auch regulatorische T-Zellen in größerem Maße im Blut von dcSSc Patienten vor. In der Literatur wird dieses Thema weiterhin kontrovers diskutiert. Mittlerweile findet sich allerdings ein schwacher Konsens, dass vermehrt regulatorische T-Zellen bei den SSc-Patienten im Blut zu finden sind.[145]

Will man die Funktionalität der regulatorischen T-Zellen betrachten bzw. quantifizieren, bietet sich als Methode ein so genannter Suppressionsassay an, der in dieser Arbeit verwendet wurde. Über verschiedene, bereits in 1.3.2.2 erwähnte Mechanismen kann die regulatorische T-Zelle die Proliferation von Effektor Zellen supprimieren. Die Gesamtheit dieser Effekte versucht man mit dieser Methode abzubilden.

Bereits *Papp et al.*[146] zeigten die suppressiven Effekte von autologen Tregs auf PBMCs bzw. Effektor-T-Zellen bei Patienten mit SSc. Wie in unseren Ergebnissen konnte dort auch eine verminderte suppressive Aktivität der Tregs von Patienten mit SSc im Vergleich zu gesunden Probanden gezeigt werden.

Vor allem auf CD4+ T-Zellen scheint der suppressive Effekt der Tregs vermindert zu sein.

Eine Erklärung dafür könnte die verminderte Produktion von intrazellulärem IL-10 in Tregs von SSc-Patienten sein, die wir zeigen konnten. (Tabelle 13)

Es herrscht mittlerweile Konsens, dass die suppressiven Effekte der regulatorischen T-Zellen und somit auch ihre gesamte Funktion bei der SSc geschwächt sind.[145]

Da die Aufreinigung von reinen Tregs aus PBMCs eine große, bislang nicht lösbare Herausforderung darstellt, spiegelt die Methode der Suppressionsassay nicht alleine die Effekte der Tregs auf Effektor Zellen wider.

Aufgereinigt wurden regulatorische T-Zellen nach Expression von CD4, CD25 und dem Fehlen von CD127. Allerdings kann mittels magnetischer Perlen keine Aufreinigung von Zellen durchgeführt werden, die FoxP3 exprimieren, da dies ja ein intrazellulärer Transkriptionsfaktor ist. Dieser zeichnet aber regulatorische T-Zellen per Definition aus. Wie oben gezeigt exprimieren nur circa 60% der CD4+CD25+ CD127- T-Zellen nach unseren Daten FoxP3. Somit exprimierten circa 40% der in den Suppressionsassays als Tregs bezeichneten Zellen kein FoxP3, dem wichtigsten Transkriptionsfaktor der regulatorischen T-Zellen.

Auch *Klein et al.*[147] zeigten ähnlich zu unseren Daten, dass CD4+ CD25+ CD127- T-Zell Populationen zu 34 % kein FoxP3 exprimierten.

#### 4.5 Perspektiven und Auswirkungen der Arbeit

Mit den hier gezeigten Daten konnten die aktuellen Meinungen in der Literatur bezüglich des Anteils der Th17 Zellen an der Pathogenese und Inflammation bei der SSc bestätigt werden. Ebenfalls zeigte sich die auch postulierte Schwäche suppressiver Mechanismen der regulatorischen T-Zellen. Neu war allerdings, dass profibrotische Zytokine wie IL-13 und IL-4 auch in signifikantem Maße durch bisher in der Pathogenese der SSc nicht groß beachtete CD8<sup>+</sup> T-Zellen gebildet werden. Ebenfalls bestätigte sich die Vermutung, dass nahezu alle oben genannten Aspekte bei Patienten mit schwerem klinischem Phänotyp, also hauptsächlich der dcSSc, verstärkt zu finden waren.

Letztendlich bleibt die Ursache der SSc weiterhin ein Rätsel, allerdings könnten in Zukunft durch weiter fortschreitende Erfolge in der Erforschung der einzelnen in den Fokus gerückten „Puzzleteile“ wie die Th17 und Tregs Fortschritte beim Verständnis erzielt werden, auch wenn T-Zellen nur einer von mehreren Bausteinen in der Ätiologie dieser Erkrankung sind.

Schwierig wird sein ausreichend große Patientenkollektive für größere Studien zu rekrutieren. Dies war auch ein Schwachpunkt dieser Arbeit, da die 26 rekrutierten SSc-Patienten einen sehr heterogenen klinischen Phänotyp, unterschiedliche Krankheitsdauern und unterschiedliche verwendete Therapeutika boten.

T-Zellen wurden in dieser Arbeit allesamt in vitro untersucht, was natürlich nicht den Bedingungen in vivo entspricht. Zur Messung der Zytokinproduktion wurden die T-Zellen in dieser Arbeit mit PMA stimuliert. Dieser Stimulus führt zwar zu einer sehr starken Antwort und Aktivierung der T-Zellen, repräsentiert allerdings nicht die Immunantwort, die in den T-Zellen der SSc-Patienten in vivo entsteht. Außerdem wurden alle untersuchten T-Zellen aus dem peripheren Blut von Patienten isoliert. Wie in dieser Arbeit geschildert, tragen sie zwar vermutlich durch Zytokinproduktion und ggf. Migration in läsionales Gewebe bei der SSc zur Inflammation bei, doch würden T-Zellen, die man direkt aus der Haut oder betroffenen Organen isoliert, natürlich validere und genauere Aussagen über die Entzündung in der Haut sowie die Verbindung zur Fibrose liefern. Dies wird sich aber aufgrund der deutlich geringeren Anzahl an extrahierbaren Zellen in der Haut sehr schwierig gestalten.

Die hier gewonnenen Erkenntnisse zeigen, dass möglicherweise Tregs von SSc-Patienten schlechter suppressionsfähig und damit funktional unwirksam sind. Eine Stabilisierung oder Expansion autologer Tregs könnte ein Ansatzpunkt für neue Therapien der SSc darstellen. Bereits *Belle et al.*[148] konnten zeigen, dass zum Beispiel die Blockade von IL-27 in Mäusen zu einer Verbesserung des klinischen Phänotyps der GVHD führt. Dies wurde durch die FoxP3-stabilisierende und somit auch Treg-induzierende Wirkung dieser Blockade begründet. Weiterhin gibt es verschiedene Ansätze in präklinischen Studien, Patienten mit chronischen Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen mit ex- und in-vivo expandierten Tregs zu behandeln, um das Ausmaß der Abstoßungsreaktion zu minimieren.[149] Patienten mit SSc wurden in diese Studien allerdings bis dato noch nicht eingeschlossen.

Ebenfalls erscheint es logisch, dass Therapien, die die Mehrproduktion von IL-17 unterdrücken, einen Effekt haben könnten. Der IL-17 Antikörper Secukinumab wurde bereits 2015 zur Behandlung der Psoriasis in der EU und den USA erfolgreich zugelassen. Studien zur Therapie von Patienten mit rheumatoider Arthritis und ankylosierender Spondylitis folgen aktuell.[150]

Vielleicht folgen in der Zukunft auch Studien zur Therapie bei SSc-Patienten mit diesem erfolgversprechenden Antikörper.

Auch könnten neuartige Antikörper gegen das vermutlich profibrotisch wirkende IL-13, was nach unseren Daten vermehrt in SSc-Patienten durch T-Zellen produziert wird, bei SSc-Patienten getestet werden. Lebrikizumab ist ein monoklonaler Antikörper gegen IL-13, der bis dato in Studien bei Patienten mit Asthma bronchiale erfolgreich eingesetzt wird.[151]



## 5 Zusammenfassung

Unklarheit herrscht bis dato über die genauen Zusammenhänge bei der Pathogenese der SSc. T-Zellen scheinen allerdings eine entscheidende Rolle in der Entstehung dieser Autoimmunerkrankung zu spielen. Zur Untersuchung dieses Aspekts wurde in dieser Arbeit eine Charakterisierung peripher zirkulierender T-Zellen sowie eine Überprüfung der Funktionalität von regulatorischen T-Zellen vorgenommen.

Generell zeigte sich in den peripheren CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen der SSc-Patienten ein höheres Maß an Inflammationsbereitschaft und Immunoseneszenz. Dies spiegelte sich einerseits durch niedrigere Proportionen von naiven CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen und größeren Mengen an Gedächtnis-T-Zellen wider.

Andererseits zeigte sich, dass gerade die bei SSc-Patienten vermehrt vorkommenden CD4<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen durch Produktion von TNF- $\alpha$ , einem proinflammatorischen Zytokin, zur vermehrten proinflammatorische Bereitschaft der T-Zellen bei SSc-Patienten beitragen könnten.

CD8<sup>+</sup> Effektor und Gedächtniszellpopulationen zeigten im Gegensatz zu den CD4<sup>+</sup> T-Zellen keine vermehrte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ . Allerdings konnten sie als Produzenten von in der Literatur als profibrotisch beschriebenen Zytokinen wie IL-13 und IL-4 identifiziert werden.

Besonders bei Patienten mit der diffusen Form der SSc zeigten sich die beschriebenen Auffälligkeiten in deutlicherem Ausmaß als bei den Patienten mit der limitierten kutanen Form, die mit einem leichteren klinischen Phänotyp einhergeht.

Eine besonders in den Fokus gerückte Population der CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind die Th-17 Zellen, denen vor allem proinflammatorische Aspekte und Beteiligung an der Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankungen zugeschrieben wird. Hier konnte gezeigt werden, dass Th-17 vor allem bei SSc-Patienten mit schwereren Phänotypen der Erkrankung in vermehrtem Maße zu finden sind und dass diese im Vergleich zu gesunden Probanden auch vermehrt Interleukin-17 produzieren, was als Leitzytokin der Th17 gilt und starke inflammatorische Effekte bedingt.

Regulatorische T-Zellen, die man als Gegenpol der inflammatorischen T-Zellen sieht, scheinen in Patienten mit SSc zwar vermehrt vorhanden zu sein, allerdings zeigten sich die suppressiven Effekte der Tregs bei SSc-Patienten vermindert. Dies könnte zum Beispiel an der hier gezeigten verminderten Produktion von IL-10 durch Tregs bei SSc-

Patienten liegen.

Eine Stabilisierung des Treg-Phänotyps, wie sie bereits experimentell bei GVHD-Patienten bzw. bei Patienten mit chronischen Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen durchgeführt wird, könnte nach Interpretation unserer Ergebnisse ebenfalls bei der SSc einen Versuch wert sein.

Außerdem könnten Studien zur Effektivität von bereits bei anderen Autoimmunerkrankungen erprobten Antikörpern gegen IL-17A und IL-13 bei SSc-Patienten erfolgversprechend sein, da in der Literatur der negative Einfluss dieser profibrotischen Zytokine auf das Fortschreiten der Erkrankung suggeriert wird und in dieser Arbeit die vermehrte Produktion der zwei Zytokine durch verschiedene T-Zell-Subpopulationen bei SSc-Patienten gezeigt wurde.

## **Abstract**

There is still ambiguity about the exact links in the immunopathogenesis of SSc. T-cells seem to play a crucial role in the emergence of this autoimmune disease. To investigate this aspect, a characterization of circulating peripheral T-cells and examination of the functionality of regulatory T-cells was performed in this project.

Generally, a higher level of disposition for inflammation, as well as immunosenescence was shown in peripheral CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells in SSc-patients. This could be reflected through lower proportions of naïve CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells and higher amounts of memory T-cells in SSc-patients.

Otherwise, it was shown here, that especially CD4<sup>+</sup> memory T-cells, which appear in higher proportions in SSc-patients, may have a significant impact on the disposition for inflammation through production of the proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$ .

CD8<sup>+</sup> effector and memory T-cell populations showed no elevated levels in production of proinflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  in comparison to CD4<sup>+</sup> T-cells. Nevertheless, they could be identified as producers of the most likely profibrotic cytokines IL-13 and IL-4.

Especially in patients with the diffuse form of SSc all the previously described features were seen in a larger extent, as in patients with limited cutaneous SSc, the less severe clinical phenotype of the disease.

An especially interesting population of CD4<sup>+</sup> T-cells are Th-17 cells that seem to play important roles in the development of autoimmune disorders through proinflammatory mechanisms. Here, we showed that this population of T-cells was primarily occurring in higher proportions in SSc-patients with the more severe phenotype of the disease. Also, we showed that Th-17 T-cells of SSc-patients produce larger proportions of IL-17, the most important and inflammatory cytokine of this population of T-cells.

Regulatory T-cells, as a counterpart of inflammatory T-cells seemed to appear in higher proportions in SSc-patients but showed less suppressive effects in SSc-patients. This may be explained due to diminished production of IL-10 by Tregs in SSc-patients that was shown here.

A stabilization of the Treg-phenotype in SSc-patients that is already being tested in GVHD-patients and patients with chronic organ-rejection problems after organ-transplantation, may contribute to treatment of SSc. Besides, studies to test the

effectiveness of antibodies against IL-17A and IL-13 that were already tested in other autoimmune disorders should be done, because the present literature suggests a negative influence of these two cytokines on the progression of SSc and our data show the increased production of those two cytokines by T-cell-populations that were investigated in this thesis.

## **6 Publikationen aus Daten dieser Arbeit**

Teile der hier vorliegenden Ergebnisse wurden in abgewandelter Form in folgenden Aufsätzen zur Veröffentlichung eingereicht oder bereits publiziert:

- Klein, Matthias; Schmalzing, Marc; Almanzar, Giovanni; Benoit, Sandrine; Hamm, Henning; Tony, Hans-Peter; Goebeler, Matthias; Prelog, Martina: *Contribution of CD8+ T cells to inflammatory cytokine production in systemic sclerosis (SSc)*. Autoimmunity, 2016: p. 1-15.[152]
- Giovanni Almanzar, Matthias Klein, Marc Schmalzing, Deborah Hillgardt, Nady El Hajj, Hermann Kneitz, Vanessa Wild, Andreas Rosenwald, Sandrine Benoit, Henning Hamm, Hans-Peter Tony, Thomas Haaf, Matthias Goebeler, Martina Prelog: *Disease Manifestation and Inflammatory Activity as Modulators of Th17/Treg Balance and RORC/FoxP3 Methylation in Systemic Sclerosis*. Int Arch Allergy Immunol, 2016. 171(2): p. 141-154.[153]
- Giovanni Almanzar; Marc Schmalzing; Matthias Klein; Deborah Hillgardt; Patrick Morris; Kerstin Höfner; Nady El Hajj; Hermann Kneitz; Vanessa Wild; Andreas Rosenwald; Sandrine Benoit; Henning Hamm; Hans-Peter Tony; Thomas Haaf; Matthias Goebeler; Martina Prelog  
„Potential role of CCR7-expressing memory and effector CD4+ T cells for cytokine production in Systemic sclerosis (SSc)“, zur Publikation eingereicht (bisher nicht publiziert)

## 7 Literaturverzeichnis

1. Black, C.M., *Scleroderma--clinical aspects*. J Intern Med, 1993. **234**(2): p. 115-8.
2. *Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee*. Arthritis Rheum, 1980. **23**(5): p. 581-90.
3. LeRoy, E.C., et al., *Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis*. J Rheumatol, 1988. **15**(2): p. 202-5.
4. Genth, E. and T. Krieg, [*Systemic sclerosis - diagnosis and classification*]. Z Rheumatol, 2006. **65**(4): p. 268-74.
5. LeRoy, E.C. and T.A. Medsger, Jr., *Criteria for the classification of early systemic sclerosis*. J Rheumatol, 2001. **28**(7): p. 1573-6.
6. van den Hoogen, F., et al., *2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative*. Arthritis Rheum, 2013. **65**(11): p. 2737-47.
7. Chiffhot, H., et al., *Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review*. Semin Arthritis Rheum, 2008. **37**(4): p. 223-35.
8. Black, C.M., *Scleroderma and fasciitis in children*. Curr Opin Rheumatol, 1995. **7**(5): p. 442-8.
9. Elhai, M., et al., *Trends in mortality in patients with systemic sclerosis over 40 years: a systematic review and meta-analysis of cohort studies*. Rheumatology (Oxford), 2012. **51**(6): p. 1017-26.
10. Tyndall, A.J., et al., *Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database*. Ann Rheum Dis, 2010. **69**(10): p. 1809-15.
11. Ioannidis, J.P., et al., *Mortality in systemic sclerosis: an international meta-analysis of individual patient data*. Am J Med, 2005. **118**(1): p. 2-10.
12. Alba, M.A., et al., *Early- versus late-onset systemic sclerosis: differences in clinical presentation and outcome in 1037 patients*. Medicine (Baltimore), 2014. **93**(2): p. 73-81.
13. Sampaio-Barros, P.D., et al., *Survival, causes of death, and prognostic factors in systemic sclerosis: analysis of 947 Brazilian patients*. J Rheumatol, 2012. **39**(10): p. 1971-8.
14. Rassner, G., *Dermatologie - Lehrbuch und Atlas*. Elsevier Verlag, München, 2009. **9. Auflage**.
15. Herrick, A.L. and M. Cutolo, *Clinical implications from capillaroscopic analysis in patients with Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(9): p. 2595-604.
16. Wigley, F.M., *Clinical practice. Raynaud's Phenomenon*. N Engl J Med, 2002. **347**(13): p. 1001-8.
17. LeRoy, E.C. and T.A. Medsger, Jr., *Raynaud's phenomenon: a proposal for classification*. Clin Exp Rheumatol, 1992. **10**(5): p. 485-8.

18. Wirz, E.G., et al., *Incidence and predictors of cutaneous manifestations during the early course of systemic sclerosis: a 10-year longitudinal study from the EUSTAR database.* Ann Rheum Dis, 2015.
19. Akesson, A. and F.A. Wollheim, *Organ manifestations in 100 patients with progressive systemic sclerosis: a comparison between the CREST syndrome and diffuse scleroderma.* Br J Rheumatol, 1989. **28**(4): p. 281-6.
20. Bortolotti, M., et al., *Gastric emptying and interdigestive antroduodenal motility in patients with esophageal scleroderma.* Am J Gastroenterol, 1991. **86**(6): p. 743-7.
21. Duchini, A. and S.L. Sessoms, *Gastrointestinal hemorrhage in patients with systemic sclerosis and CREST syndrome.* Am J Gastroenterol, 1998. **93**(9): p. 1453-6.
22. Cobden, I., et al., *Small intestinal bacterial growth in systemic sclerosis.* Clin Exp Dermatol, 1980. **5**(1): p. 37-42.
23. Hamelroy, J., et al., *Comparative Esophageal and Anorectal Motility in Scleroderma.* Gastroenterology, 1985. **88**(1): p. 1-7.
24. van Bon, L., et al., *Proteome-wide analysis and CXCL4 as a biomarker in systemic sclerosis.* N Engl J Med, 2014. **370**(5): p. 433-43.
25. Kane, G.C., et al., *Lung involvement in systemic sclerosis (scleroderma): relation to classification based on extent of skin involvement or autoantibody status.* Respir Med, 1996. **90**(4): p. 223-30.
26. McNearney, T.A., et al., *Pulmonary involvement in systemic sclerosis: associations with genetic, serologic, sociodemographic, and behavioral factors.* Arthritis Rheum, 2007. **57**(2): p. 318-26.
27. Bielefeld, P., et al., *[Systemic scleroderma and cancers: 21 cases and review of the literature].* Rev Med Interne, 1996. **17**(10): p. 810-3.
28. Pontifex, E.K., C.L. Hill, and P. Roberts-Thomson, *Risk factors for lung cancer in patients with scleroderma: a nested case-control study.* Ann Rheum Dis, 2007. **66**(4): p. 551-3.
29. Nikpour, M., et al., *Prevalence, correlates and clinical usefulness of antibodies to RNA polymerase III in systemic sclerosis: a cross-sectional analysis of data from an Australian cohort.* Arthritis Res Ther, 2011. **13**(6): p. R211.
30. Traub, Y.M., et al., *Hypertension and renal failure (scleroderma renal crisis) in progressive systemic sclerosis. Review of a 25-year experience with 68 cases.* Medicine (Baltimore), 1983. **62**(6): p. 335-52.
31. Teixeira, L., et al., *Mortality and risk factors of scleroderma renal crisis: a French retrospective study of 50 patients.* Ann Rheum Dis, 2008. **67**(1): p. 110-6.
32. Chu, S.Y., et al., *Increased risk of acute myocardial infarction in systemic sclerosis: a nationwide population-based study.* Am J Med, 2013. **126**(11): p. 982-8.
33. Janosik, D.L., et al., *Heart disease in systemic sclerosis.* Semin Arthritis Rheum, 1989. **19**(3): p. 191-200.
34. Morrisroe, K.B., M. Nikpour, and S.M. Proudman, *Musculoskeletal Manifestations of Systemic Sclerosis.* Rheum Dis Clin North Am, 2015. **41**(3): p. 507-18.
35. Avouac, J., et al., *Joint and tendon involvement predict disease progression in systemic sclerosis: a EUSTAR prospective study.* Ann Rheum Dis, 2016. **75**(1): p. 103-9.

36. Herrick, A.L., et al., *Observational study of treatment outcome in early diffuse cutaneous systemic sclerosis*. J Rheumatol, 2010. **37**(1): p. 116-24.
37. van den Hoogen, F.H., et al., *Comparison of methotrexate with placebo in the treatment of systemic sclerosis: a 24 week randomized double-blind trial, followed by a 24 week observational trial*. Br J Rheumatol, 1996. **35**(4): p. 364-72.
38. Pope, J.E., et al., *A randomized, controlled trial of methotrexate versus placebo in early diffuse scleroderma*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(6): p. 1351-8.
39. Tashkin, D.P., et al., *Cyclophosphamide versus placebo in scleroderma lung disease*. N Engl J Med, 2006. **354**(25): p. 2655-66.
40. Martinez, F.J. and W.J. McCune, *Cyclophosphamide for scleroderma lung disease*. N Engl J Med, 2006. **354**(25): p. 2707-9.
41. van Laar, J.M., et al., *Autologous hematopoietic stem cell transplantation vs intravenous pulse cyclophosphamide in diffuse cutaneous systemic sclerosis: a randomized clinical trial*. JAMA, 2014. **311**(24): p. 2490-8.
42. Jordan, S., et al., *Effects and safety of rituximab in systemic sclerosis: an analysis from the European Scleroderma Trial and Research (EUSTAR) group*. Ann Rheum Dis, 2015. **74**(6): p. 1188-94.
43. *Comparison of sustained-release nifedipine and temperature biofeedback for treatment of primary Raynaud phenomenon. Results from a randomized clinical trial with 1-year follow-up*. Arch Intern Med, 2000. **160**(8): p. 1101-8.
44. Korn, J.H., et al., *Digital ulcers in systemic sclerosis: prevention by treatment with bosentan, an oral endothelin receptor antagonist*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(12): p. 3985-93.
45. Steen, V.D. and T.A. Medsger, Jr., *Long-term outcomes of scleroderma renal crisis*. Ann Intern Med, 2000. **133**(8): p. 600-3.
46. Sjogren, R.W., *Gastrointestinal motility disorders in scleroderma*. Arthritis Rheum, 1994. **37**(9): p. 1265-82.
47. Avouac, J., et al., *Articular involvement in systemic sclerosis*. Rheumatology (Oxford), 2012. **51**(8): p. 1347-56.
48. *Systemic sclerosis: current pathogenetic concepts and future prospects for targeted therapy*. Lancet, 1996. **347**(9013): p. 1453-8.
49. Liu, M., et al., *New insights into CD4(+) T cell abnormalities in systemic sclerosis*. Cytokine Growth Factor Rev, 2016. **28**: p. 31-6.
50. Guiducci, S., et al., *Mechanisms of vascular damage in SSc--implications for vascular treatment strategies*. Rheumatology (Oxford), 2008. **47 Suppl 5**: p. v18-20.
51. Sollberg, S., et al., *Elevated expression of beta 1 and beta 2 integrins, intercellular adhesion molecule 1, and endothelial leukocyte adhesion molecule 1 in the skin of patients with systemic sclerosis of recent onset*. Arthritis Rheum, 1992. **35**(3): p. 290-8.
52. Kahaleh, M.B., *Endothelin, an endothelial-dependent vasoconstrictor in scleroderma. Enhanced production and profibrotic action*. Arthritis Rheum, 1991. **34**(8): p. 978-83.
53. Kahaleh, M.B. and E.C. LeRoy, *Autoimmunity and vascular involvement in systemic sclerosis (SSc)*. Autoimmunity, 1999. **31**(3): p. 195-214.
54. Cantatore, F.P., et al., *Angiogenesis Dysregulation in the Pathogenesis of Systemic Sclerosis*. Biomed Res Int, 2017. **2017**: p. 5345673.



55. Ahmed, S.S., et al., *Induction of apoptosis and fibrillin 1 expression in human dermal endothelial cells by scleroderma sera containing anti-endothelial cell antibodies.* Arthritis Rheum, 2006. **54**(7): p. 2250-62.
56. Shi-Wen, X., et al., *Scleroderma lung fibroblasts exhibit elevated and dysregulated type I collagen biosynthesis.* Arthritis Rheum, 1997. **40**(7): p. 1237-44.
57. Scharffetter, K., B. Lankat-Buttgereit, and T. Krieg, *Localization of collagen mRNA in normal and scleroderma skin by in-situ hybridization.* Eur J Clin Invest, 1988. **18**(1): p. 9-17.
58. Gilbane, A.J., C.P. Denton, and A.M. Holmes, *Scleroderma pathogenesis: a pivotal role for fibroblasts as effector cells.* Arthritis Res Ther, 2013. **15**(3): p. 215.
59. Hoyles, R.K., et al., *An essential role for resident fibroblasts in experimental lung fibrosis is defined by lineage-specific deletion of high-affinity type II transforming growth factor beta receptor.* Am J Respir Crit Care Med, 2011. **183**(2): p. 249-61.
60. Leroy, E.C., *Connective tissue synthesis by scleroderma skin fibroblasts in cell culture.* J Exp Med, 1972. **135**(6): p. 1351-62.
61. Bhattacharyya, S., J. Wei, and J. Varga, *Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities.* Nat Rev Rheumatol, 2012. **8**(1): p. 42-54.
62. Distler, J.H., et al., *Hypoxia-induced increase in the production of extracellular matrix proteins in systemic sclerosis.* Arthritis Rheum, 2007. **56**(12): p. 4203-15.
63. Nishijima, C., et al., *Autoantibody against matrix metalloproteinase-3 in patients with systemic sclerosis.* Clin Exp Immunol, 2004. **138**(2): p. 357-63.
64. Reveille, J.D., D.H. Solomon, and G. American College of Rheumatology Ad Hoc Committee of Immunologic Testing, *Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: anticentromere, Scl-70, and nucleolar antibodies.* Arthritis Rheum, 2003. **49**(3): p. 399-412.
65. Nihtyanova, S.I. and C.P. Denton, *Autoantibodies as predictive tools in systemic sclerosis.* Nat Rev Rheumatol, 2010. **6**(2): p. 112-6.
66. Steen, V.D., *Autoantibodies in systemic sclerosis.* Bull Rheum Dis, 1996. **45**(6): p. 6-8.
67. Roumm, A.D., et al., *Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. Quantification, subtyping, and clinical correlations.* Arthritis Rheum, 1984. **27**(6): p. 645-53.
68. Baraut, J., et al., *Relationship between cytokine profiles and clinical outcomes in patients with systemic sclerosis.* Autoimmun Rev, 2010. **10**(2): p. 65-73.
69. Zuber, J.P. and F. Spertini, *Immunological basis of systemic sclerosis.* Rheumatology (Oxford), 2006. **45 Suppl 3**: p. iii23-5.
70. Radstake, T.R., et al., *The pronounced Th17 profile in systemic sclerosis (SSc) together with intracellular expression of TGFbeta and IFNgamma distinguishes SSc phenotypes.* PLoS One, 2009. **4**(6): p. e5903.
71. Radstake, T.R., et al., *Increased frequency and compromised function of T regulatory cells in systemic sclerosis (SSc) is related to a diminished CD69 and TGFbeta expression.* PLoS One, 2009. **4**(6): p. e5981.
72. Antiga, E., et al., *Regulatory T cells in the skin lesions and blood of patients with systemic sclerosis and morphea.* Br J Dermatol, 2010. **162**(5): p. 1056-63.

73. Klein, S., et al., *Reduction of regulatory T cells in skin lesions but not in peripheral blood of patients with systemic sclerosis*. *Ann Rheum Dis*, 2011. **70**(8): p. 1475-81.
74. Sanges, S., et al., *Role of B cells in the pathogenesis of systemic sclerosis*. *Rev Med Interne*, 2016.
75. Abraham, D.J., et al., *Overview of pathogenesis of systemic sclerosis*. *Rheumatology (Oxford)*, 2009. **48 Suppl 3**: p. iii3-7.
76. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition*. *Cell*, 1997. **91**(3): p. 295-8.
77. Henkart, P.A. and M. Catalfamo, *CD8+ effector cells*. *Adv Immunol*, 2004. **83**: p. 233-52.
78. Jenkins, M.K., et al., *In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells*. *Annu Rev Immunol*, 2001. **19**: p. 23-45.
79. Schmitt, N. and H. Ueno, *Regulation of human helper T cell subset differentiation by cytokines*. *Curr Opin Immunol*, 2015. **34**: p. 130-6.
80. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. *J Immunol*, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
81. Bonecchi, R., et al., *Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s*. *J Exp Med*, 1998. **187**(1): p. 129-34.
82. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. *Annu Rev Immunol*, 1989. **7**: p. 145-73.
83. Annunziato, F., et al., *Defining the human T helper 17 cell phenotype*. *Trends Immunol*, 2012. **33**(10): p. 505-12.
84. Acosta-Rodriguez, E.V., et al., *Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells*. *Nat Immunol*, 2007. **8**(9): p. 942-9.
85. Furuzawa-Carballeda, J., M.I. Vargas-Rojas, and A.R. Cabral, *Autoimmune inflammation from the Th17 perspective*. *Autoimmun Rev*, 2007. **6**(3): p. 169-75.
86. Sakaguchi, S., et al., *FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(7): p. 490-500.
87. Rose, N.R., *Predictors of autoimmune disease: autoantibodies and beyond*. *Autoimmunity*, 2008. **41**(6): p. 419-28.
88. Davidson, A. and B. Diamond, *Autoimmune diseases*. *N Engl J Med*, 2001. **345**(5): p. 340-50.
89. Dighiero, G. and N.R. Rose, *Critical self-epitopes are key to the understanding of self-tolerance and autoimmunity*. *Immunol Today*, 1999. **20**(9): p. 423-8.
90. Nossal, G.J., *A purgative mastery*. *Nature*, 2001. **412**(6848): p. 685-6.
91. Buckner, J.H. and S.F. Ziegler, *Functional analysis of FOXP3*. *Ann N Y Acad Sci*, 2008. **1143**: p. 151-69.
92. Zhou, X., et al., *Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(9): p. 1000-7.

93. Martinez, G.J., et al., *Regulation and function of proinflammatory TH17 cells*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1143**: p. 188-211.
94. Vincent, A., *Unravelling the pathogenesis of myasthenia gravis*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(10): p. 797-804.
95. Latif, R., et al., *The thyroid-stimulating hormone receptor: impact of thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor antibodies on multimerization, cleavage, and signaling*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2009. **38**(2): p. 319-41, viii.
96. Mahnke, Y.D., et al., *The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets*. Eur J Immunol, 2013. **43**(11): p. 2797-809.
97. Sallusto, F., et al., *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. Nature, 1999. **401**(6754): p. 708-12.
98. Prelog, M., *Aging of the immune system: a risk factor for autoimmunity?* Autoimmun Rev, 2006. **5**(2): p. 136-9.
99. Appay, V., et al., *Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues*. Cytometry A, 2008. **73**(11): p. 975-83.
100. Lugli, E., et al., *Transient and persistent effects of IL-15 on lymphocyte homeostasis in nonhuman primates*. Blood, 2010. **116**(17): p. 3238-48.
101. Kohler, S. and A. Thiel, *Life after the thymus: CD31+ and CD31- human naive CD4+ T-cell subsets*. Blood, 2009. **113**(4): p. 769-74.
102. Kimmig, S., et al., *Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood*. J Exp Med, 2002. **195**(6): p. 789-94.
103. Fan, P.T., et al., *Effect of corticosteroids on the human immune response: comparison of one and three daily 1 gm intravenous pulses of methylprednisolone*. J Lab Clin Med, 1978. **91**(4): p. 625-34.
104. Newman, K., et al., *Management of immune cytopenias in patients with systemic lupus erythematosus - Old and new*. Autoimmun Rev, 2013. **12**(7): p. 784-91.
105. Fiocco, U., et al., *Early phenotypic activation of circulating helper memory T cells in scleroderma: correlation with disease activity*. Ann Rheum Dis, 1993. **52**(4): p. 272-7.
106. Sakkas, L.I. and C.D. Platsoucas, *Is systemic sclerosis an antigen-driven T cell disease?* Arthritis Rheum, 2004. **50**(6): p. 1721-33.
107. Deleuran, B. and D.J. Abraham, *Possible implication of the effector CD4+ T-cell subpopulation TH17 in the pathogenesis of systemic sclerosis*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2007. **3**(12): p. 682-3.
108. Abdulahad, W.H., et al., *CD4-positive effector memory T cells participate in disease expression in ANCA-associated vasculitis*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1107**: p. 22-31.
109. Giovannetti, A., et al., *Analyses of T cell phenotype and function reveal an altered T cell homeostasis in systemic sclerosis. Correlations with disease severity and phenotypes*. Clin Immunol, 2010. **137**(1): p. 122-33.
110. Hasegawa, M., et al., *Elevated serum tumor necrosis factor-alpha levels in patients with systemic sclerosis: association with pulmonary fibrosis*. J Rheumatol, 1997. **24**(4): p. 663-5.

111. Gruschwitz, M.S., et al., *In situ expression and serum levels of tumor necrosis factor-alpha receptors in patients with early stages of systemic sclerosis*. J Rheumatol, 1997. **24**(10): p. 1936-43.
112. Davalos-Miszlitz, A.C., et al., *Generalized multi-organ autoimmunity in CCR7-deficient mice*. Eur J Immunol, 2007. **37**(3): p. 613-22.
113. Jones, J.L., et al., *Human autoimmunity after lymphocyte depletion is caused by homeostatic T-cell proliferation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(50): p. 20200-5.
114. Berger, A., *Th1 and Th2 responses: what are they?* BMJ, 2000. **321**(7258): p. 424.
115. Rosenbloom, J., et al., *Inhibition of excessive scleroderma fibroblast collagen production by recombinant gamma-interferon. Association with a coordinate decrease in types I and III procollagen messenger RNA levels*. Arthritis Rheum, 1986. **29**(7): p. 851-6.
116. Grassegger, A., et al., *Interferon-gamma in the treatment of systemic sclerosis: a randomized controlled multicentre trial*. Br J Dermatol, 1998. **139**(4): p. 639-48.
117. Kawaguchi, Y., et al., *Increased interleukin 1 receptor, type I, at messenger RNA and protein level in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **184**(3): p. 1504-10.
118. Yanaba, K., et al., *Serum interleukin 9 levels are increased in patients with systemic sclerosis: association with lower frequency and severity of pulmonary fibrosis*. J Rheumatol, 2011. **38**(10): p. 2193-7.
119. Ciccia, F., et al., *Interleukin-9 and T helper type 9 cells in rheumatic diseases*. Clin Exp Immunol, 2016. **185**(2): p. 125-32.
120. Denton, C.P. and D.J. Abraham, *Transforming growth factor-beta and connective tissue growth factor: key cytokines in scleroderma pathogenesis*. Curr Opin Rheumatol, 2001. **13**(6): p. 505-11.
121. Herman, S., et al., *Methotrexate selectively modulates TH1/TH2 balance in active rheumatoid arthritis patients*. Clin Exp Rheumatol, 2008. **26**(2): p. 317-23.
122. Boin, F., et al., *T cell polarization identifies distinct clinical phenotypes in scleroderma lung disease*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(4): p. 1165-74.
123. Fuschiotti, P., et al., *Interleukin-13-producing CD8+ T cells mediate dermal fibrosis in patients with systemic sclerosis*. Arthritis Rheum, 2013. **65**(1): p. 236-46.
124. Fuschiotti, P., *CD8+ T cells in systemic sclerosis*. Immunol Res, 2011. **50**(2-3): p. 188-94.
125. O'Reilly, S., T. Hugle, and J.M. van Laar, *T cells in systemic sclerosis: a reappraisal*. Rheumatology (Oxford), 2012. **51**(9): p. 1540-9.
126. Huang, X.L., et al., *Role of anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-13 in systemic sclerosis*. Inflamm Res, 2015. **64**(3-4): p. 151-9.
127. Salmon-Ehr, V., et al., *Expression of interleukin-4 in scleroderma skin specimens and scleroderma fibroblast cultures. Potential role in fibrosis*. Arch Dermatol, 1996. **132**(7): p. 802-6.
128. Sempowski, G.D., et al., *Subsets of murine lung fibroblasts express membrane-bound and soluble IL-4 receptors. Role of IL-4 in enhancing fibroblast proliferation and collagen synthesis*. J Immunol, 1994. **152**(7): p. 3606-14.

129. Aoudjehane, L., et al., *Interleukin-4 induces the activation and collagen production of cultured human intrahepatic fibroblasts via the STAT-6 pathway*. *Lab Invest*, 2008. **88**(9): p. 973-85.
130. Distler, J.H., et al., *Monocyte chemoattractant proteins in the pathogenesis of systemic sclerosis*. *Rheumatology (Oxford)*, 2009. **48**(2): p. 98-103.
131. Hickman, H.D., et al., *CXCR3 chemokine receptor enables local CD8(+) T cell migration for the destruction of virus-infected cells*. *Immunity*, 2015. **42**(3): p. 524-37.
132. Villarroel, V.A., et al., *CXCR3-mediated skin homing of autoreactive CD8 T cells is a key determinant in murine graft-versus-host disease*. *J Invest Dermatol*, 2014. **134**(6): p. 1552-60.
133. Li, H. and A. Rostami, *IL-9: basic biology, signaling pathways in CD4+ T cells and implications for autoimmunity*. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2010. **5**(2): p. 198-209.
134. Macaulay, R., A.N. Akbar, and S.M. Henson, *The role of the T cell in age-related inflammation*. *Age (Dordr)*, 2013. **35**(3): p. 563-72.
135. Masson, F., et al., *Id2 represses E2A-mediated activation of IL-10 expression in T cells*. *Blood*, 2014. **123**(22): p. 3420-8.
136. Liu, Z.J., et al., *Potential role of Th17 cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. *World J Gastroenterol*, 2009. **15**(46): p. 5784-8.
137. Gaffen, S.L., *The role of interleukin-17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. *Curr Rheumatol Rep*, 2009. **11**(5): p. 365-70.
138. Annunziato, F., et al., *Phenotypic and functional features of human Th17 cells*. *J Exp Med*, 2007. **204**(8): p. 1849-61.
139. Kurasawa, K., et al., *Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis*. *Arthritis Rheum*, 2000. **43**(11): p. 2455-63.
140. Fenoglio, D., et al., *Alteration of Th17 and Treg cell subpopulations co-exist in patients affected with systemic sclerosis*. *Clin Immunol*, 2011. **139**(3): p. 249-57.
141. Murata, M., et al., *Clinical association of serum interleukin-17 levels in systemic sclerosis: is systemic sclerosis a Th17 disease?* *J Dermatol Sci*, 2008. **50**(3): p. 240-2.
142. Yang, X., et al., *Increased frequency of Th17 cells in systemic sclerosis is related to disease activity and collagen overproduction*. *Arthritis Res Ther*, 2014. **16**(1): p. R4.
143. Cosmi, L., et al., *Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor*. *J Exp Med*, 2008. **205**(8): p. 1903-16.
144. Truchetet, M.E., et al., *Increased frequency of circulating Th22 in addition to Th17 and Th2 lymphocytes in systemic sclerosis: association with interstitial lung disease*. *Arthritis Res Ther*, 2011. **13**(5): p. R166.
145. Slobodin, G. and D. Rimar, *Regulatory T Cells in Systemic Sclerosis: a Comprehensive Review*. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2016.
146. Papp, G., et al., *Altered T-cell and regulatory cell repertoire in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis*. *Scand J Rheumatol*, 2011. **40**(3): p. 205-10.
147. Klein, S., et al., *CD127(low/-) and FoxP3(+) expression levels characterize different regulatory T-cell populations in human peripheral blood*. *J Invest Dermatol*, 2010. **130**(2): p. 492-9.

148. Belle, L., et al., *Blockade of interleukin-27 signaling reduces GVHD in mice by augmenting Treg reconstitution and stabilizing Foxp3 expression*. *Blood*, 2016. **128**(16): p. 2068-2082.
149. Khan, M.A., *T regulatory cell mediated immunotherapy for solid organ transplantation: A clinical perspective*. *Mol Med*, 2016. **22**.
150. Sanford, M. and K. McKeage, *Secukinumab: first global approval*. *Drugs*, 2015. **75**(3): p. 329-38.
151. Bujarski, S., A.D. Parulekar, and N.A. Hanania, *Lebrikizumab in the treatment of asthma*. *Expert Opin Biol Ther*, 2016.
152. Klein, M., et al., *Contribution of CD8+ T cells to inflammatory cytokine production in systemic sclerosis (SSc)*. *Autoimmunity*, 2016: p. 1-15.
153. Almanzar, G., et al., *Disease Manifestation and Inflammatory Activity as Modulators of Th17/Treg Balance and RORC/FoxP3 Methylation in Systemic Sclerosis*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2016. **171**(2): p. 141-154.

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b> Schematische Darstellung der Ficoll Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung der PBMC.....	27
<b>Abbildung 2:</b> Beispielhafter FACS Dotplot zur Darstellung der Reinheit der Isolation von CD4+CD25+ T-Zellen. Die oben dargestellte Population entspricht einer 95% Reinheit.	34
<b>Abbildung 3</b> Naive CD4+ T-Zellen. ....	44
<b>Abbildung 4</b> CCR7 neg. CD4+ späte, transitionale Gedächtnis-T-Zellen.....	46
<b>Abbildung 5</b> CXCR3 in CD4+ T-Zellen.....	49
<b>Abbildung 6</b> TNF- $\alpha$ in CD4+ T-Zellen.....	51
<b>Abbildung 7</b> Repräsentatives Beispiel der intrazellulären Zytokine der CD4 pos. T-Zellen von SSc-Patienten und gesunden Kontrollen. ....	54
<b>Abbildung 8</b> Intrazelluläres IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 und IL-13 in verschiedenen Subpopulationen der CD4+ T-Zellen. ....	55
<b>Abbildung 9</b> Repräsentatives Beispiel des Gatings der CD4+ Subpopulationen und deren IFN- $\gamma$ Zytokinproduktion anhand einer gesunden Kontrolle und eines SSc-Patienten. ....	56
<b>Abbildung 10</b> Repräsentative Beispiele für TNF- $\alpha$ und IL-4 Zytokinproduktion in oben beschriebenen CD4+ Subpopulationen anhand einer gesunden Kontrolle und eines SSc-Patienten.. ....	57
<b>Abbildung 11</b> Repräsentatives Beispiel für die IL-13 Zytokinproduktion oben beschriebener CD4+ T-Zell Subpopulationen anhand einer gesunden Kontrolle und eines SSc-Patienten. ....	58
<b>Abbildung 12</b> FACS Dotplots mit Färbung von CD4, CCR6 und IL-17 (intrazellulär) als repräsentatives Beispiel eines SSc-Patienten und einer gesunden Kontrolle. ....	59
<b>Abbildung 13</b> CCR6+ in CD4+ T-Zellen.....	60
<b>Abbildung 14</b> IL-17 in CD4+ T-Zellen.....	61
<b>Abbildung 15</b> FACS Dotplots eines SSc-Patienten und einer gesunden Kontrolle mit Färbung von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen CD4, CD25, CD127 und FOXP3 (intrazellulär) als repräsentatives Beispiel der Färbung von Tregs.. ....	63
<b>Abbildung 16</b> Tregs in CD4+ T-Zellen .....	65
<b>Abbildung 17</b> Intrazelluläres IL-10 in CD4+ T-Zell Subpopulationen.....	66
<b>Abbildung 18</b> CXCR3+ in CD8+ T-Zellen.....	69
<b>Abbildung 19</b> Intrazelluläre IL-4 Produktion in CD8+ T-Zellen.....	71
<b>Abbildung 20</b> Intrazelluläre IL-13 Produktion in CD8+ T-Zellen.....	72
<b>Abbildung 21</b> Repräsentatives Beispiel der intrazellulären Zytokine der CD8 pos. T-Zellen von SSc-Patienten und gesunden Kontrollen. ....	76
<b>Abbildung 22</b> Intrazelluläres IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 und IL-13 in verschiedenen Subpopulationen der CD8+ T-Zellen. ....	77
<b>Abbildung 23</b> Intrazelluläres IL-10 in verschiedenen CD8+ T-Zell Subpopulationen.....	78
<b>Abbildung 24</b> Repräsentatives Beispiel des Gatings der CD8+ Subpopulationen und deren IFN- $\gamma$ Zytokinproduktion anhand einer gesunden Kontrolle und eines SSc-Patienten.....	79

<b>Abbildung 25</b> Repräsentative Beispiele für TNF- $\alpha$ und IL-4 Zytokinproduktion anhand einer gesunden Kontrolle und eines SSc-Patienten. ....	80
<b>Abbildung 26</b> Repräsentatives Beispiel für die IL-13 Zytokinproduktion in Subpopulationen anhand einer gesunden Kontrolle und eines SSc-Patienten.....	81
<b>Abbildung 27</b> Suppressionsindex auf Lymphozyten und CD4+ T-Zellen von gesunden Kontrollen (HC) und SSc-Patienten.. ....	83
<b>Abbildung 28</b> Repräsentatives Beispiel eines Suppressionsassays eines SSc-Patienten und einer gesunden Kontrolle.....	83

## **Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1</b> Klassifikation der dcSSc und lcSSc nach LeRoy et al.[3, 4].....	2
<b>Tabelle 2</b> ACR/EULAR Kriterien zur Klassifikation der Systemischen Sklerose von 2013.[6] .	3
<b>Tabelle 3</b> Färbeschema der T-Zell Charakterisierung .....	30
<b>Tabelle 4</b> Differenzierung von T-Zell Subpopulationen .....	39
<b>Tabelle 5</b> Patientenkollektiv und Gesunde Kontrollen.....	42
<b>Tabelle 6</b> Prozentuale Verteilung der übergeordneten CD4+-, CD8+-T-Zellen, B-, NK- und NK-T-Zellen auf die Gesamtzahl der Lymphozyten in SSc-, dcSSc-, lcSSc-Patienten und gesunden Kontrollen.....	43
<b>Tabelle 7</b> Prozentuale Verteilung von CD4+ T-Zell Subpopulation auf die Gesamtzahl der CD4+ T-Zellen bei SSc-Patienten mit und ohne Organbeteiligung. ....	45
<b>Tabelle 8</b> Proportionale Verteilung von CD4+ T-Zell Subpopulationen in SSc-, dcSSc-, lcSSc-Patienten und Gesunden Kontrollen. ....	48
<b>Tabelle 9</b> Proportionale Verteilung der Expression von Chemokinrezeptoren auf CD4+ T-Zellen in SSc-, dcSSc-, lcSSc-Patienten und Gesunden Kontrollen.....	50
<b>Tabelle 10</b> Proportionale Verteilung der intrazellulären Zytokine der CD4+ T-Zellen in SSc-, dcSSc-, lcSSc-Patienten und Gesunden Kontrollen. ....	52
<b>Tabelle 11</b> Proportionale Verteilung der Th-17 Marker auf T-Zellen in SSc-, dcSSc-, lcSSc-Patienten und Gesunden Kontrollen. ....	60
<b>Tabelle 12</b> Proportionale Verteilung des intrazellulären IL-17 in CD4+ T-Zellen in SSc-, dcSSc-, lcSSc-Patienten und gesunden Kontrollen. ....	62
<b>Tabelle 13</b> Proportionale Verteilung von regulatorischen T-Zellen und intrazellulärem IL-10 in CD4+ T-Zellen bei SSc-, dcSSc-, lcSSc-Patienten und gesunden Kontrollen. ....	64
<b>Tabelle 14</b> Proportionale Verteilung der CD8+ T-Zell Subpopulationen in SSc-, dcSSc-, lcSSc-Patienten und gesunden Kontrollen.....	68
<b>Tabelle 15</b> Proportionale Verteilung der Chemokinrezeptoren auf CD8+ T-Zellen in SSc-, dcSSc-, lcSSc-Patienten und Gesunden Kontrollen. ....	70
<b>Tabelle 16</b> Proportionale Verteilung der intrazellulären Zytokine in CD8+ T-Zellen in SSc-, dcSSc-, lcSSc-Patienten und gesunden Kontrollen. ....	73
<b>Tabelle 17</b> Serumzytokine von SSc-Patienten (n=23, davon n(lcSSc)=16 und n(dcSSc)=7) und gesunden Kontrollen (n=25).....	84



## **Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
ACA	anti-Zentromer Antikörper
AF700	Alexa Fluor 700
ANA	Antinukleäre Antikörper
ANCA	Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper
APC	Allophycocyanin
Aqua dest	destilliertes Wasser
BV421	Brilliant Violet 421
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CCL	Chemokinligand
CCR	Chemokinrezeptor
CD	Cluster of differentiation, „Unterscheidungsgruppen
CFSE	Carboxyfluorescein-succinimidylester
CRP	C-reaktives Protein
CXCR3	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 3
dcSSc	diffus kutane Systemische Sklerose
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii/aliae/alia („und andere“)
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FoxP3	Forkhead-Box-Protein 3
FSC	Forward scatter
GVHD	Graft-versus-Host-Erkrankung
HC	gesunde Kontrolle, „healthy control“
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IL	Interleukin
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
lcSSc	limitiert kutane Systemische Sklerose
Lsg	Lösung
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex“
MMF	Mycophenolatmofetil
mRSS	modifizierter Rodnan Skin Score
MTX	Methotrexat
neg.	negativ
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyanin 7
PerCp	Peridinin-Chlorophyll-Komplex
PerCP-Cy5.5	Peridinin-Chlorophyll-Komplex Cyanin 5.5
pos.	positiv
RNA	Ribonucleinsäure
ROR $\gamma$ t	RAR-related orphan receptor gamma
SSc	Systemische Sklerose
SSC	Sideward scatter
T-Zellen	Thymus Zellen
T-Z.	T-Zellen
TCR	T-Zell Rezeptor
TGF- $\beta$	transforming growth factor $\beta$
Th1	T-Helfer Zellen Typ I
Th2	T-Helfer Zellen Typ II
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
Treg / Tregs	regulatorische T-Zellen

## **Danksagung**

Zuerst möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Martina Prelog bedanken, die es mir mit der Vergabe dieser Arbeit erst ermöglicht hat, zu promovieren und die mein Interesse in der experimentellen Forschung geweckt hat. Die Betreuung war durch den regelmäßigen Austausch in Laborbesprechungen immer sehr engagiert, offen und motivierend.

Ein weiterer großer Dank gilt Herrn Dr. Giovanni Almanzar, dem ich das Einlernen in die Methoden zu verdanken habe. Ebenfalls hatte er jederzeit ein offenes Ohr für entstehende Probleme während der verschiedenen Experimente.

Ebenso bedanke ich mich bei den technischen Assistentinnen des Labors: Kerstin Höfner, Barbara Ottensmeier, Gabi Haase und Angelika Will, die allzeit hilfsbereit waren, während der Arbeit im Labor.

Ein herzlicher Dank gilt ebenfalls meiner Ehefrau Lisa und meinen Eltern, Carola und Christian für die Unterstützung während des Studiums.

