

Aus der Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie

der Universität zu Lübeck

Direktorin: Prof. Dr. med. Gabriela Riemekasten

---

**Zum Einfluss ausgewählter Anti-G-Protein-gekoppelter-  
Rezeptor-Autoantikörper auf das Zytokinprofil in chronisch-  
entzündlichen Autoimmunerkrankungen**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Tatjana Kathleen Wildner geb. Dreyer

aus Detmold

Lübeck 2025

1. Berichterstatter\*in: Prof. Dr. med. Gabriela Riemekasten

Ko-Betreuer\*in: Prof. Dr. med. Karl-Friedrich Klotz

2. Berichterstatter\*in: Prof. Dr. med. Cyrus Khandanpour

Tag der mündlichen Prüfung: 09.10.2025

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 13.10.2025

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>6</b>
<b>1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>8</b>
1.1 Chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankungen.....	8
1.1.1 Systemische Sklerose .....	8
1.1.1.1 Epidemiologie.....	8
1.1.1.2 Pathogenese .....	9
1.1.1.3 Klinik .....	10
1.1.1.4 Klassifikation und Diagnostik .....	11
1.1.1.5 Therapie .....	13
1.1.2 Riesenzellarteriitis .....	14
1.1.2.1 Epidemiologie.....	14
1.1.2.2 Pathogenese .....	14
1.1.2.3 Klinik .....	15
1.1.2.4 Klassifikation und Diagnostik .....	15
1.1.2.5 Therapie .....	16
1.1.3 Rheumatoide Arthritis .....	16
1.1.3.1 Epidemiologie.....	16
1.1.3.2 Pathogenese .....	16
1.1.3.3 Klinik .....	17
1.1.3.4 Klassifikation und Diagnostik .....	17
1.1.3.5 Therapie .....	19
1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) und deren Expression auf Immunzellen ...	19
1.3 Autoantikörper gegen GPCR.....	22
1.4 Fragestellung .....	24
<b>2. MATERIAL .....</b>	<b>25</b>
2.1 PatientInnen.....	25
2.2 Reagenzien und Puffer.....	29
2.3 Verbrauchsmaterialien.....	30

2.4 Geräte.....	31
<b>3.     METHODEN .....</b>	<b>33</b>
3.1 Isolierung von IgG aus Serumproben mittels Affinitätschromatographie.....	33
3.1.1 IgG-Isolierung mittels Protein G-Schwerkraftsäulen.....	33
3.1.2 IgG-Isolierung mittels <i>Fast liquid protein chromatography</i> (FPLC).....	33
3.1.3 Gelelektrophorese.....	35
3.2 Isolierung von PBMZ aus Vollblut gesunder SpenderInnen.....	36
3.3 Etablierung des PBMZ-Stimulationsversuches .....	37
3.3.1 Bestimmung der geeigneten Konzentration von Fetalem Kälberserum (FKS) im Zellkulturmedium.....	37
3.3.2 Bestimmung der Versuchsdauer und der Positivkontrolle .....	37
3.4 Kultivierung und Stimulierung von PBMZ.....	38
3.5 Messung von Anti-GPCR-Autoantikörpern in Serum und IgG-Eluaten.....	39
3.6 Messung von Zytokinen in den Überständen des Stimulationsversuches und in zugehörigen Seren .....	39
3.7 Statistische Analyse.....	40
<b>4.     ERGEBNISSE.....</b>	<b>41</b>
4.1 Etablierung der IgG-Isolation mittels Affinitätschromatographie.....	41
4.2 Etablierung der Kultivierungsbedingungen der PBMZ.....	44
4.2.1 1 % FKS im Kulturmedium als geeignete Konzentration zur Kultivierung von PBMZ bestimmt .....	45
4.2.2 PMA plus Ionomycin eignet sich als Positivkontrolle im Stimulationsversuch über 24 Stunden.....	47
4.3 Veränderte Anti-GPCR-Autoantikörper-Konzentrationen in Seren und IgG-Fraktionen von PatientInnen mit SSc .....	49
4.4 Veränderte Konzentrationen von Interleukin-6 im Serum von PatientInnen mit RA...	53
4.5 Keine Unterschiede der Zytokinkonzentrationen gemessen in den Überständen nach Stimulation von PBMZ mit IgG .....	54

<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>57</b>
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	57
5.2	Diskussion der Methodik.....	57
5.3	Diskussion der Ergebnisse.....	61
5.3.1	Anti- $\beta_1$ - und Anti- $\beta_2$ -Adrenozeptor-Autoantikörper in SSc und anderen Erkrankungen.....	61
5.3.2	Anti-GPCR-Autoantikörper in RZA und RA.....	62
5.3.3	Korrelationen zwischen Anti-GPCR-Autoantikörpern im Serum und in zugehörigen IgG-Fraktionen.....	63
5.3.4	Zytokinkonzentrationen im Serum von PatientInnen mit chronisch-entzündlichen Autoimmunerkrankungen .....	63
5.3.4.1	Interleukin-2 .....	64
5.3.4.2	Interleukin-4 .....	65
5.3.4.3	Interleukin-6 .....	65
5.3.5	Einfluss von Anti-GPCR-Autoantikörpern auf die Zytokinausschüttung aus Immunzellen .....	66
5.4	Limitationen.....	68
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>70</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>71</b>
<b>8.</b>	<b>ANHÄNGE</b> .....	<b>80</b>
8.1	Anti-GPCR-Autoantikörper-Konzentrationen im Serum und in IgG-Fraktionen.....	80
8.2	Zytokinkonzentrationen im Serum .....	85
8.3	Zytokinkonzentrationen in den Überständen nach Stimulation von PBMZ mit IgG ....	86
8.4	Abbildungsverzeichnis .....	90
8.5	Tabellenverzeichnis .....	93
8.6	Ethikvotum .....	94
<b>9.</b>	<b>DANKSAGUNGEN</b> .....	<b>95</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
ACPA	Antikörper gegen das citrullinierte Peptid
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
Ak	Autoantikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
AT1R	Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1
BSA	Bovines Serumalbumin
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CaSR	Calciumsensitiver Rezeptor
CCL18	<i>CC-chemokine ligand 18</i>
CRP	C-reaktives Protein
CXCR3	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 3
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DAS28	<i>Disease Activity Score 28</i>
DMARD	<i>Disease-modifying antirheumatic drugs</i> , deutsch: krankheitsmodifizierende antirheumatische Medikamente
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i> , deutsch: Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung
dSSc	diffus-kutane Systemische Sklerose
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ETAR	Endothelin-Rezeptor Typ A
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
Fab	<i>Fragment antigen binding</i>
Fc	<i>Fragment crystallisable</i>
FKS	Fetales Kälberserum
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
FSC-A	<i>Forward scatter</i> , deutsch: Vorwärtsstreulicht
GERD	Gastroösophageale Reflux-Erkrankung
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i> , deutsch: G-Protein-gekoppelter Rezeptor
HC	<i>Healthy control</i> , deutsch: gesunde Kontrolle
i.v.	intravenös
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G

Iono	Ionomycin
IVIG	Intravenös verabreichtes Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharide
lSSc	limitiert-kutane Systemische Sklerose
M	männlich
MCP	Metakarpophalangealgelenk
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> , deutsch: Haupthistokompatibilitätskomplex
PAR2	Protease-aktivierter Rezeptor 2
PBMZ	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PIP	Proximales Interphalangealgelenk
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
RA	Rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktor
RANK-L	<i>Receptor activator of NF-κB ligand</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RZA	Riesenzellerteriitis
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , deutsch: Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEB	Staphylokokken-Enterotoxin-B
SSc	Systemische Sklerose
SSC-A	<i>Side scatter</i> , deutsch: Seitwärtsstreulicht
W	weiblich
x g	x-faches der Erdbeschleunigung

# 1. Einleitung und Fragestellung

## 1.1 Chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankungen

Autoimmunerkrankungen sind dadurch charakterisiert, dass sich das Immunsystem gegen den eigenen Körper richtet, es zum sogenannten Verlust der Immuntoleranz kommt (L. Wang et al., 2015). In der Folge tritt je nach Erkrankung in bestimmten Geweben, Organen oder auch systemisch eine entzündliche Reaktion auf, die letztendlich zur Schädigung des jeweiligen Gewebes führt (Davidson & Diamond, 2001). Häufig sind daran auch Autoantikörper beteiligt, die gegen körpereigene Antigene gerichtet sind und auf unterschiedliche Arten zur Schädigung beitragen können (Ludwig et al., 2017). Ein gewisses Maß an Autoimmunität scheint auch in gesunden Individuen aufzutreten; erst wenn es zu einer Dysregulation innerhalb des Immunsystems hin zu einer verstärkten Reaktion auf Autoantigene kommt, können Autoimmunerkrankungen ausbrechen (L. Wang et al., 2015). Auch wenn der genaue Auslöser meist noch unklar ist, wird angenommen, dass sowohl eine genetische Prädisposition als auch Umweltfaktoren eine Rolle in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen spielen (Cho & Gregersen, 2011; Smilek & St. Clair, 2015; L. Wang et al., 2015). Die klinische Relevanz wird vor dem Hintergrund deutlich, dass bis zu 5 % der Bevölkerung an einer Autoimmunerkrankung leiden (L. Wang et al., 2015).

Folgende Autoimmunerkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis werden hier näher betrachtet: die Systemische Sklerose (SSc), die Riesenzellerarteriitis (RZA), welche als Großgefäßvaskulitis in die große Gruppe der Vaskulitiden fällt (Jennette et al., 2013), und die Rheumatoide Arthritis (RA).

### 1.1.1 Systemische Sklerose

Die SSc ist eine Bindegewebserkrankung, die durch eine Fibrose der Haut, aber auch von inneren Organen, und eine Vaskulopathie insbesondere der kleinen Gefäße charakterisiert ist (Gabrielli et al., 2009). Unter den rheumatischen Erkrankungen hat die SSc die höchste Mortalität (Denton & Khanna, 2017).

#### 1.1.1.1 Epidemiologie

Die SSc ist eine seltene Erkrankung, an der insbesondere PatientInnen mittleren Alters erkranken (Meier et al., 2012). Die Zahlen für Prävalenz und Inzidenz in Europa zeigen eine große Spannweite: Bergamasco *et al.* gaben in einer systematischen Übersichtsarbeit die Prävalenz mit 7,2 bis 33,9 pro 100.000 Individuen an, die jährliche Inzidenz mit 0,6 bis 2,3

pro 100.000 Individuen. Frauen sind deutlich häufiger betroffen als Männer; für Europa wird ein Verhältnis von 3,8:1 bis 11,5:1 angegeben. Die Variationen in den Werten sind zum einen auf geographische Unterschiede, zum anderen aber auch auf Unterschiede in der Methodik der verschiedenen von Bergamasco *et al.* zusammengefassten Studien zurückzuführen (Bergamasco *et al.*, 2019). Bei Männern verläuft die SSc häufig schwerer (Elhai *et al.*, 2016; Hughes *et al.*, 2020). Hinsichtlich des Überlebens bei SSc ist das männliche Geschlecht ein negativer Prognosefaktor (Peoples *et al.*, 2016).

### 1.1.1.2 Pathogenese

Die Ursache der SSc ist bislang unbekannt. In genetisch vulnerablen Individuen scheinen äußere Einflüsse die Erkrankung auslösen zu können; auch epigenetische Phänomene könnten dabei eine entscheidende Rolle spielen (Broen *et al.*, 2014). Genetische Studien zeigten, dass verschiedene Varianten im Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. *Major histocompatibility complex*, MHC), aber auch Polymorphismen in Nicht-MHC-Genen mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert sind (Makino & Jinnin, 2016). Unter den Umwelteinflüssen geht u.a. eine Exposition gegenüber Silizium, verschiedenen Lösungsmittel und womöglich auch gegenüber Silikon-Brustimplantaten mit einem erhöhtem SSc-Risiko einher (Rubio-Rivas *et al.*, 2017). Auch einige Chemotherapeutika und eine Krebserkrankung an sich scheinen das Erkrankungsrisiko erhöhen zu können bzw. möglicherweise mit der SSc zusammenzuhängen (Denton & Khanna, 2017).

Die Pathophysiologie der SSc ist ebenfalls nicht gänzlich verstanden. Am Beginn der Erkrankung scheint insbesondere die Vaskulopathie und eine entzündliche Komponente zu stehen; im Verlauf nimmt dann die Fibrose zu, bis diese in späteren Stadien im Vordergrund steht (Gabrielli *et al.*, 2009). Verschiedenste Zelltypen werden als beteiligt angesehen: Es kommt zur Schädigung und nachfolgender Apoptose von Endothelzellen, Zellen der glatten Muskulatur der Gefäßwände proliferieren hingegen (Guiducci *et al.*, 2008). Fibroblasten produzieren vermehrt extrazelluläre Matrix wie bspw. Kollagen, was zur Fibrosierung führt (Gabrielli *et al.*, 2009). Aber auch Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems scheinen maßgeblich beteiligt zu sein: Perivaskulär finden sich Infiltrate aus Makrophagen, B- und T-Zellen (Kahaleh & LeRoy, 1999), in Hautläsionen sind überwiegend CD4<sup>+</sup>-T-Zellen nachzuweisen (Roumm *et al.*, 1984). Verschiedene Zytokine scheinen ebenfalls von Relevanz in der Pathogenese der SSc zu sein, wie u.a. der *Transforming growth factor β*, Interleukin-2, Interleukin-4, Interleukin-6 und Interleukin-13 (Shima, 2021). Aber auch anderen Molekülen wie dem Vasokonstriktor Endothelin-1 wird eine Beteiligung an der Pathogenese

zugesprochen (Kahaleh & LeRoy, 1999). Es wird angenommen, dass B-Zellen bzw. Plasmazellen insbesondere durch die Produktion von Autoantikörpern ebenfalls zur SSc-Entstehung beitragen. Während viele Autoantikörper v.a. von diagnostischem Interesse sind, beschrieben unter 1.1.1.4, scheinen funktionelle Autoantikörper eine pathophysiologische Rolle zu spielen (Benfaremo et al., 2020). Dazu zählen bspw. Autoantikörper, die gegen bestimmte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (engl. *G-protein coupled receptors*, GPCR) gerichtet sind (Cabral-Marques & Riemekasten, 2017a); diese werden unter 1.3 näher betrachtet.

### **1.1.1.3 Klinik**

Häufiges Erstsymptom und im Verlauf bei über 90 % der SSc-PatientInnen auftretend ist ein sekundäres Raynaud-Syndrom (Meier et al., 2012). Dieses Phänomen ist durch Vasospasmen insbesondere an den Händen, aber auch an den Akren im Allgemeinen, gekennzeichnet. Bei Auftreten kommt es zu einer typischen Hautverfärbung, bei der allerdings einzelne Phasen fehlen können: Zunächst blässen zumeist die Finger aufgrund der Vasospastik ab, anschließend kommt es zur hypoxischen Blaufärbung. Zuletzt werden die Finger durch eine reaktive Hyperämie rot. Das Raynaud-Syndrom kann für die Betroffenen schmerzhaft und insgesamt sehr beeinträchtigend sein. Getriggert wird das Raynaud-Syndrom typischerweise durch Kälte, aber auch durch andere Einflüsse wie emotionale Anspannung (Pauling et al., 2019).

Das charakteristische Symptom der SSc, die Hautfibrose, kann in seiner Ausprägung individuell stark variieren. Nach dem Hautbefall werden drei Verlaufsformen unterschieden: Bei der limitiert-kutanen SSc (lSSc) ist die Fibrose auf die Haut distal der Ellenbogen bzw. Kniegelenke und das Gesicht begrenzt; bei der diffus-kutanen SSc (dSSc) überschreitet die Hautfibrose die Ellenbogen bzw. Kniegelenken nach proximal. Die Hautfibrose kann in seltenen Fällen komplett fehlen, dann als SSc sine scleroderma bezeichnet (Denton & Khanna, 2017). Männer haben häufiger eine dSSc (Elhai et al., 2016; Hughes et al., 2020).

Bei der SSc können verschiedenste Organe von der Vaskulopathie und/oder Fibrose betroffen sein, hier seien nur die am häufigsten betroffenen aufgeführt: An der Lunge kann es sowohl zu einer Lungenfibrose als auch zu einer pulmonal-arteriellen Hypertonie kommen, bei einer Nierenbeteiligung droht eine renale Krise. Am Herzen kann bspw. eine Myokarditis auftreten. Auch eine Beteiligung des Gastrointestinaltraktes, die abhängig von der Höhe zu verschiedensten Symptomen führen kann, ist häufig zu beobachten (Denton & Khanna, 2017; Gabrielli et al., 2009). Es kann außerdem zu Kontrakturen, Kalzinosen, Ulzerationen insbesondere der Finger und Teleangiektasien kommen. Auch unspezifische Symptome wie

muskuloskelettale Beschwerden, eine Fatigue-Symptomatik und Gewichtsverlust können auftreten (Denton & Khanna, 2017).

Insbesondere pulmonale und kardiale Komplikationen sind für die hohe Mortalität der SSc verantwortlich (Elhai et al., 2017; Tyndall et al., 2010).

#### 1.1.1.4 Klassifikation und Diagnostik

Zur Klassifizierung der SSc werden häufig die 2013 von einem Komitee des *American College of Rheumatology* (ACR) und der *European League Against Rheumatism* (EULAR) festgelegten Klassifikationskriterien herangezogen (van den Hoogen et al., 2013); die einzelnen Kriterien sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Kriterien wurden festgelegt, um die Eintrittskriterien von SSc-PatientInnen zu Studien zu definieren und sind nicht als Diagnosekriterien gedacht. Typischerweise werden die in den Kriterien aufgeführten Befunde aber in der SSc-Diagnostik erhoben und können somit als Orientierung dienen. Nichtsdestotrotz sollten auch andere typische Befunde, wie bspw. eine Kalzinose oder Dysphagie, die in der Klassifikation nicht berücksichtigt werden, in die Diagnosefindung miteinfließen (van den Hoogen et al., 2013).

Tabelle 1. **ACR/EULAR-Klassifikation der Systemischen Sklerose (SSc) von 2013 nach van den Hoogen et al. (2013).** ACR = *American College of Rheumatology*, EULAR = *European League Against Rheumatism*, MCP = Metakarpophalangealgelenk, PIP = proximales Interphalangealgelenk, RNA = Ribonukleinsäure.

Kriterien	Subkriterien	Wertung
Hautverdickung der Finger an beiden Händen nach proximal über die MCP reichend	-	9
Hautverdickung der Finger (nur den höchsten Wert berücksichtigen)	geschwollene Finger	2
	Sklerodaktylie der Finger distal der MCP, aber proximal der PIP	4
Läsionen der Fingerkuppen (nur den höchsten Wert berücksichtigen)	Ulzera der Fingerkuppen	2
	Grübchenartige Narben	3
Teleangiektasien	-	2
Abnorme Nagelfalzkapillaren	-	2

Pulmonal-arterielle Hypertonie und/oder interstitielle Lungenerkrankung (maximal 2 Punkte)	-	2
Raynaud-Phänomen	-	3
SSc-assoziierte Antikörper (Anti-Zentromer-, Anti-Topoisomerase 1- und/oder Anti-RNA-Polymerase-III-Antikörper) (maximal 3 Punkte)	-	3
<b>PatientInnen mit einem Score von 9 oder mehr Punkten werden als an SSc-erkrankt klassifiziert.</b>		

Eine frühe Diagnosestellung ist bei der SSc besonders wichtig, da nahezu die Hälfte aller über einen Zeitraum von zehn Jahren beobachteten Organmanifestationen innerhalb von zwei Jahren nach Beginn der Raynaud-Symptomatik auftreten (Jaeger et al., 2016). Ergibt sich aus Anamnese und körperlicher Untersuchung der Verdacht auf das Vorliegen einer SSc, sollten ausgewählte Antikörperwerte im Blut bestimmt werden: Bei über 90 % der PatientInnen finden sich Antinukleäre Antikörper (ANA) (Meier et al., 2012). Bei einem Großteil dieser ANA-positiven PatientInnen lassen sich mit der SSc assoziierte Antikörper nachweisen: Bei der dSSc ist der am häufigsten auftretende Antikörper gegen die Topoisomerase 1 gerichtet, Anti-Zentromer-Antikörper sind dagegen vermehrt bei der limitiert-kutanen Verlaufsform nachzuweisen (Mierau et al., 2011). Schnell und nicht-invasiv durchzuführen ist eine Kapillarmikroskopie der Nagelfalz, die eine Unterscheidung zwischen primärem und sekundärem Raynaud-Syndrom ermöglicht: Bei der sekundären Form im Rahmen der SSc zeigen sich häufig Veränderungen wie Megakapillaren, Hämorrhagien und im späteren Krankheitsverlauf gefäßfreie Zonen, beim primären Raynaud-Syndrom stellen sich die Kapillaren hingegen morphologisch normal bzw. nur geringgradig verändert dar (Kubo et al., 2018; Pauling et al., 2019).

Ist eine SSc diagnostiziert, sollte sich in jedem Fall ein ausführliches Screening auf bereits bestehende Organmanifestationen anschließen. Dazu gehören bspw. eine Lungenfunktionsuntersuchung und eine Echokardiographie, aber auch zusätzliche labordiagnostische Untersuchungen, die im Rahmen von Nachfolgeuntersuchungen regelmäßig wiederholt werden sollten (Denton & Khanna, 2017).

### 1.1.1.5 Therapie

Es existiert bisher keine kausale Therapie der SSc (Nagaraja et al., 2015). Aufgrund der großen klinischen Heterogenität und der Seltenheit der Erkrankung sollten an der Betreuung von SSc-PatientInnen spezialisierte Zentren beteiligt sein (Denton & Khanna, 2017; Kowal-Bielecka et al., 2017). Die EULAR hat 2017 aktualisierte Empfehlungen zur pharmakologischen Therapie der SSc veröffentlicht, welche in Tabelle 2 zusammengefasst sind (Kowal-Bielecka et al., 2017).

Tabelle 2. Therapieempfehlung zur Behandlung der Systemischen Sklerose (SSc) der *European League Against Rheumatism* zusammengefasst nach Kowal-Bielecka et al. (2017). ACE = Angiotensin-konvertierendes Enzym, GERD = Gastroösophageale Reflux-Erkrankung, i.v. = intravenös, PDE = Phosphodiesterase.

Organbeteiligung	Empfehlungen
Raynaud-Syndrom	<p><b>Kalzium-Antagonisten vom Dihydropyridin-Typ</b> und <b>PDE-5-Inhibitoren</b> reduzieren Frequenz und Schwere</p> <p><b>Iloprost i.v.</b> reduziert Frequenz und Schwere, empfohlen bei schwerer Form nach oraler Therapie</p> <p><b>Fluoxetin</b> kann erwogen werden</p>
Digitale Ulzerationen	<p><b>Iloprost i.v.</b> zur Heilung</p> <p><b>PDE-5-Inhibitoren</b> zur Heilung, möglicherweise auch präventiv wirksam</p> <p><b>Bosentan</b> reduziert die Zahl neuer Ulzerationen, empfohlen bei Ulzerationen unter anderer Therapie</p>
Pulmonal-arterieller Hypertonus	<p><b>Endothelin-Rezeptor-Antagonisten, PDE-5-Inhibitoren</b> oder <b>Riociguat</b> sind zugelassen</p> <p><b>Epoprostenol i.v.</b> kann bei schwerer Form erwogen werden</p> <p><b>Iloprost</b> oder <b>Treprostinil</b> können erwogen werden</p>
Haut und interstitielle Lungenerkrankung	<p><b>Methotrexat</b> verbessert den Hautbefund in früher diffuser SSc</p> <p><b>Cyclophosphamid</b> insbesondere bei progressiver interstitieller Lungenerkrankung empfohlen</p> <p><b>Hämatopoetische Stammzelltransplantation</b> verbessert den Hautbefund und stabilisiert die Lungenfunktion, kann bei schwerer, schnell verlaufender SSc mit drohendem Organversagen erwogen werden</p>

Renale Krise	<b>ACE-Inhibitoren</b> verbessern das Überleben, sofortige Gabe <b>Glukokortikoide</b> erhöhen das Risiko für eine renale Krise, bei Gabe sollten Blutdruck und Nierenfunktion engmaschig kontrolliert werden
Gastrointestinaltrakt	<b>Protonenpumpeninhibitoren</b> bei GERD <b>Prokinetika</b> bei Motilitätsbeschwerden <b>Antibiotika</b> zur Behandlung einer bakteriellen Fehlbesiedlung des Dünndarms

Neben der Pharmakotherapie können weitere nicht-medikamentöse Therapieangebote wie bspw. Physiotherapie oder auch Wärmeanwendungen wie Paraffinbäder insbesondere eine Verbesserung der Lebensqualität erzielen (Schinke & Riemekasten, 2019).

Aktuell gibt es eine große Anzahl von Medikamenten, deren klinische Wirksamkeit in Studien untersucht wird und die in Zukunft womöglich eine zielgerichtete Therapie der SSc erlauben werden (Misra et al., 2020; Nagaraja et al., 2015).

## 1.1.2 Riesenzellerarteriitis

Die RZA ist eine Großgefäßvaskulitis, die insbesondere die Aorta und deren großen Äste, häufig auch kraniale Gefäße wie die Arteria carotis, betrifft und vor allem bei PatientInnen im höheren Alter auftritt (Dejaco et al., 2017; Jennette et al., 2013).

### 1.1.2.1 Epidemiologie

Die RZA ist die häufigste primäre Vaskulitis in Europa (Gonzalez-Gay et al., 2009; Sharma et al., 2020). Geographisch gesehen treten große Häufigkeitsunterschiede auf: Studien zeigen hohe Inzidenz- bzw. Prävalenzraten bspw. für Nordeuropa, niedrigere für Südeuropa, sodass sich Inzidenzraten von 1 bis über 40 pro 100.000 der  $\geq 50$  Jährigen ergeben (Sharma et al., 2020). Von der RZA sind mehr Frauen als Männer betroffen; eine retrospektive Studie aus den USA ergab ein Risiko von etwa 1 % für Frauen und von 0,5 % für Männer im Laufe des Lebens an einer RZA zu erkranken (Crowson et al., 2011).

### 1.1.2.2 Pathogenese

Die Ätiologie der RZA ist noch nicht geklärt. Derzeit werden sowohl eine genetische Prädisposition als auch Umwelteinflüsse, wie bspw. Infektionen, als mögliche Faktoren in der Pathogenese der RZA diskutiert (Dejaco et al., 2017; Saadoun et al., 2021; Salvarani et al., 2008).

Aus noch ungeklärten Gründen kommt es zur Aktivierung von dendritischen Zellen in der Gefäßwand; diese aktivieren über die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wiederum CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (Dejaco et al., 2017). In der Folge kommt es zur Einwanderung von Makrophagen und weiteren Immunzellen in die Gefäßwand. Wichtige Zytokine in der Pathogenese der RZA sind u.a. Interleukin-6, Interleukin-17, Interferon- $\gamma$  und Interleukin-12 (Weyand & Goronzy, 2013). Es kommt letztendlich zur Ausbildung einer typischerweise granulomatösen Entzündung mit Riesenzellen in der Gefäßwand (Salvarani et al., 2008). In der Folge kann es zu Intimahyperplasie und Gefäßverschlüssen kommen (Dejaco et al., 2017).

### **1.1.2.3 Klinik**

Typische Symptome einer RZA sind neu aufgetretene, oft temporal lokalisierte Kopfschmerzen, eine Kieferclaudicatio und Sehstörungen. Außerdem treten häufig eine B-Symptomatik und die Symptome einer Polymyalgia rheumatica auf (Hellmich et al., 2020). Mögliche Komplikationen einer RZA sind die ein- oder beidseitige Erblindung, Schlaganfälle, die Bildung von Aortenaneurysmen und Aortendissektionen sowie Extremitätenischämien (Saadoun et al., 2021).

### **1.1.2.4 Klassifikation und Diagnostik**

Zur Klassifizierung der RZA liegen die Kriterien des ACR von 1990 nach Hunder *et al.* vor. Diese beinhalten folgende fünf Punkte: Alter  $\geq$  50 Jahre bei Krankheitsbeginn, neu aufgetretener Kopfschmerz, Veränderung der Temporalarterien, erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit von  $\geq$  50 mm/Stunde, auffällige Arterienbiopsie; bei Zutreffen von drei oder mehr der fünf Punkte gilt die Klassifikation als erfüllt (Hunder et al., 1990). Diese Kriterien sollten aber, in Analogie zur Klassifikation der SSc, nicht als alleinige Diagnosekriterien angesehen bzw. genutzt werden (Dejaco et al., 2017; Salvarani et al., 2008).

Letztlich muss sich bei anamnestischem Verdacht auf eine RZA eine körperliche Untersuchung und Laboruntersuchungen anschließen. In der körperlichen Untersuchung können bspw. veränderte Temporalarterien sowie eine Überempfindlichkeit der Kopfhaut auffallen; laborchemisch zeigen sich in den meisten Fällen ein erhöhtes C-reaktives Protein (CRP) sowie eine gesteigerte Blutsenkungsgeschwindigkeit (Salvarani et al., 2008). Bei Verdacht auf eine RZA sollte schnellstmöglich die Diagnosesicherung entweder histopathologisch durch eine Temporalarterienbiopsie oder mittels bildgebender Verfahren angestrebt werden (Hellmich et al., 2020).

### **1.1.2.5 Therapie**

Den Empfehlungen der EULAR folgend besteht die Therapie der RZA aus der schnellen Einleitung einer Therapie mit Glukokortikoiden; bei Auftreten von Sehstörungen im Sinne einer plötzlichen Erblindung oder einer Amaurosis fugax im Rahmen einer RZA ist eine kurzzeitig höherdosierte Glukokortikoidgabe möglich (Hellmich et al., 2020). Hohe Raten von Glukokortikoid-assoziierten Nebenwirkungen bei RZA-PatientInnen sind beschrieben (Labarca et al., 2016). Aus diesem Grund sollten auf lange Sicht niedrige Erhaltungsdosen oder nach Möglichkeit ein Absetzen des Glukokortikoids angestrebt werden. In bestimmten PatientInnengruppen stehen Tocilizumab und Methotrexat zur Glukokortikoid-einsparenden Therapie zur Verfügung (Hellmich et al., 2020).

### **1.1.3 Rheumatoide Arthritis**

Die RA ist eine häufig auftretende Autoimmunerkrankung, die primär die Gelenke befällt, oft aber auch mit extraartikulären Organmanifestationen einhergeht (Smolen et al., 2016).

#### **1.1.3.1 Epidemiologie**

Die weltweite Prävalenz der RA beträgt etwa 500 pro 100.000 Erwachsene (Aletaha & Smolen, 2018); Inzidenzangaben liegen je nach geographischer Region bei 10 bis 50 pro 100.000 Individuen (Alamanos et al., 2006). Frauen sind häufiger betroffen als Männer; in den USA ergab sich ein Risiko von 3,6 % für Frauen und von 1,7 % für Männer im Laufe ihres Lebens an einer RA zu erkranken (Crowson et al., 2011). Menschen in jedem Alter können erkranken, die höchste Inzidenz zeigte sich in einer Kohorte in den USA aber in der Altersgruppe zwischen 65 und 74 Jahren (Myasoedova et al., 2010).

#### **1.1.3.2 Pathogenese**

Wie bei vielen anderen Autoimmunerkrankungen scheinen sowohl Umwelteinflüsse als auch epigenetische Modifikationen und eine genetische Prädisposition in MHC- und Nicht-MHC-Genen in der Entstehung der RA relevant zu sein; die genaue Ursache ist aber unklar (McInnes & Schett, 2011; Scherer et al., 2020; Smolen et al., 2016). Als Risikofaktoren werden u.a. Tabakrauchen, Übergewicht, Veränderungen des Darmmikrobioms, Infektionen und eine Parodontitis angesehen (Lin et al., 2020).

Die Pathogenese der RA ist noch nicht gänzlich geklärt. Aktuell wird sie als ein lange vor der klinischen RA-Manifestation beginnender Prozess verstanden, an dessen Beginn der Verlust der Immuntoleranz mit Bildung von Autoantikörpern steht (Weyand & Goronzy, 2021). Bei dieser Autoantikörperbildung scheinen posttranslationale Proteinmodifikationen wie Citrullinierungen eine Rolle zu spielen (Scherer et al., 2020). Im weiteren Verlauf kommt es nach Aktivierung von Endothelzellen zur Einwanderung von Monozyten, T- und

B-Zellen in die Synovialis der betroffenen Gelenke (Aletaha & Smolen, 2018). Es kommt außerdem zur Aktivierung von synovialen Fibroblasten, Chondrozyten und Osteoklasten (Smolen et al., 2016). Eine wichtige Rolle in diesem Prozess wird Zytokinen zugeschrieben, die als Signalmoleküle Interaktionen der verschiedenen Zelltypen ermöglichen. Insbesondere der Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , Interleukin-17A, Interferon- $\gamma$ , Interleukin-6 und der *Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand* (RANK-L) scheinen zur Aufrechterhaltung der Entzündung bzw. im Fall des RANK-L zur Osteoklastenaktivierung beizutragen (Lin et al., 2020). Im Zuge dieser Entzündung kommt es zur sogenannten Pannusbildung durch Hyperplasie der entzündeten Synovialis. Schreitet die Erkrankung weiter fort, treten irreversible Knorpel- und Knochenschädigungen auf (Aletaha & Smolen, 2018; Weyand & Goronzy, 2021).

### **1.1.3.3 Klinik**

Hauptsymptom der RA ist eine symmetrische Polyarthrit, die insbesondere Hände und Füße betrifft und mit Schmerzen, Schwellung und einer Morgensteifigkeit der jeweiligen Gelenke einhergeht (Aletaha & Smolen, 2018). Insbesondere bei unzureichender Therapie kann es nach längerem Krankheitsverlauf zur starken Gelenkdestruktion kommen, die zu Deformitäten und einer damit einhergehenden Behinderung führt (McInnes & Schett, 2011). Am Beginn der Erkrankung können auch unspezifische Symptome wie eine Fatigue-Symptomatik stehen (Lin et al., 2020).

Häufige extraartikuläre Manifestationen sind Rheumaknoten, eine interstitielle Lungenerkrankung und die rheumatische Vaskulitis, die vor allem Gefäße der Haut und Vasa nervorum betrifft (Aletaha & Smolen, 2018). RA-PatientInnen haben darüber hinaus ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse, welches am ehesten auf die chronisch-systemische Entzündungsreaktion zurückzuführen ist (Kitas & Gabriel, 2011).

### **1.1.3.4 Klassifikation und Diagnostik**

Auch für die RA liegen Klassifikationskriterien des ACR und der EULAR vor (Aletaha et al., 2010); die zuletzt 2010 überarbeiteten Kriterien sind in Tabelle 3 aufgeführt. Wie auch bei der SSc und der RZA sind die Kriterien nicht als Diagnosekriterien gedacht, können aber als Orientierungshilfe dienen (Aletaha et al., 2010).

**Tabelle 3. ACR/EULAR-Klassifikationskriterien der Rheumatoiden Arthritis (RA) von 2010 nach Aletaha et al. (2010).** Zur Definition kleiner und großer Gelenke sowie ausgeschlossener Gelenke und Grenzwerte der Kategorien B und C siehe Aletaha et al. (2010). ACPA = Antikörper gegen

das citrullinierte Peptid, BSG = Blutsenkungsgeschwindigkeit, CRP = C-reaktives Protein, mind. = mindestens, RF = Rheumafaktor.

<b>Kriterien</b>	<b>Punkte</b>
<b>A. Gelenkbeteiligung:</b>	
ein großes Gelenk	0
zwei bis zehn große Gelenke	1
ein bis drei kleine Gelenke (mit oder ohne Beteiligung großer Gelenke)	2
vier bis zehn kleine Gelenke (mit oder ohne Beteiligung großer Gelenke)	3
mehr als zehn Gelenke (mind. ein kleines Gelenk)	5
<b>B. Serologie</b> (mind. ein Testergebnis zur Klassifikation nötig):	
negativer RF und negativer ACPA	0
niedrig-positiver RF oder niedrig-positiver ACPA	2
hoch-positiver RF oder hoch-positiver ACPA	3
<b>C. Akute-Phase-Parameter</b> (mind. ein Testergebnis zur Klassifikation nötig):	
normales CRP und normale BSG	0
abnormales CRP oder abnormale BSG	1
<b>D. Symptombdauer:</b>	
< sechs Wochen	0
≥ sechs Wochen	1
Zielpopulation: PatientInnen, die	
1) mind. ein Gelenk haben, das klinisch definitiv eine Synovitis (Schwellung) zeigt	
2) die Synovitis nicht besser durch eine andere Erkrankung zu erklären ist	
<b>Zur Erhebung werden die Punkte der Kategorien A bis D addiert, bei einem Score von ≥ 6/10 Punkten wird ein Patient/eine Patientin als definitiv an einer RA erkrankt klassifiziert.</b>	

Ergibt sich der Verdacht auf das Vorliegen einer RA, sollten Differentialdiagnosen systematisch ausgeschlossen werden, da viele Erkrankungen mit einer schmerzhaften Entzündung von Gelenken einhergehen können (Smolen et al., 2016). Laborchemisch sollten sowohl Entzündungsparameter, die bei der RA typischerweise erhöht sind, und Autoantikörperwerte wie der Rheumafaktor und Antikörper gegen das citrullinierte Peptid bestimmt werden; liegen Autoantikörper vor, wird die RA als seropositiv bezeichnet. In Ergänzung zur körperlichen Untersuchung können eine Ultraschalluntersuchung oder eine kontrastmittelgestützte

Magnetresonanztomographie eine Synovitis nachweisen. Zur Einschätzung der Krankheitsaktivität stehen verschiedene Scores zur Verfügung wie bspw. der *Disease Activity Score 28*, kurz DAS28, der die Gelenkbeteiligung von 28 Gelenken, die Blutsenkungsgeschwindigkeit und die globale Krankheitseinschätzung des Patienten/der Patientin berücksichtigt (Lin et al., 2020).

Eine frühe Diagnose mit suffizienter Therapieinitiierung ist besonders wichtig, da so bei 90 % der PatientInnen mit früher RA ein Progress der Gelenkschädigung verhindert werden kann (Aletaha & Smolen, 2018).

### **1.1.3.5 Therapie**

Die RA ist nach wie vor nicht heilbar. Dank neuer Therapieansätze und -regime ist sie bei vielen PatientInnen mittlerweile aber gut behandelbar; empfohlen wird ein *Treat-to-Target*-Therapieprinzip, bei dem das Ziel das Erreichen einer Remission oder einer niedrigen Krankheitsaktivität ist (Aletaha & Smolen, 2018).

Grundstein der RA-Therapie sind die krankheitsmodifizierenden antirheumatischen Medikamente (engl. *Disease-modifying antirheumatic drugs*, DMARD). Hierzu zählen die konventionellen DMARD wie Methotrexat, welche als Erstlinientherapie gelten. Da die Wirkung erst verzögert einsetzt, erfolgt zu Beginn häufig eine Kombination mit Glukokortikoiden (Smolen et al., 2016). Bei Versagen der konventionellen DMARD stehen die sogenannten Biologika zur Verfügung, die meist mit einem konventionellen DMARD kombiniert werden. Wichtige Biologika sind u.a. Anti-Tumornekrosefaktor- $\alpha$ -Therapeutika wie Infliximab, der Interleukin-6-Rezeptor-Blocker Tocilizumab und Rituximab zur B-Zell-Depletion. Auch Januskinase-Inhibitoren wie Tofacitinib können zum Einsatz kommen (Aletaha & Smolen, 2018). Neben der Pharmakotherapie sind physikalische Maßnahmen wichtig, um die Bewegungsfähigkeit zu erhalten. Außerdem sollten PatientInnenschulungen bspw. zur Rauchentwöhnung erfolgen. Nicht-steroidale Antirheumatika haben keinen Effekt auf den Krankheitsprogress und sollten deswegen nur kurzfristig zur Schmerzreduktion genutzt werden (Lin et al., 2020).

## **1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) und deren Expression auf Immunzellen**

GPCR stellen mit über 800 kodierenden Genen im menschlichen Genom eine der größten Gruppe von Membranproteinen überhaupt dar (Venkatakrisnan et al., 2013). Auf der Oberfläche von Zellen exprimiert ermöglichen GPCR die Kommunikation von Zellen mit ihrer

Umgebung und sind so an vielen physiologischen Vorgängen im menschlichen Körper beteiligt (Rosenbaum et al., 2009). Ihre klinische Relevanz zeigt sich darin, dass etwa 30 % aller zugelassenen Medikamente ihre Wirkung über GPCR entfalten (Hauser et al., 2017; Jacoby et al., 2006). Auf molekularer Ebene sind GPCR durch sieben transmembranäre Domänen charakterisiert, die als  $\alpha$ -Helices angeordnet sind; verbunden sind diese über je drei extrazelluläre und intrazelluläre Schleifen. Der N-Terminus liegt extrazellulär, der C-Terminus intrazellulär (Venkatakrisnan et al., 2013). Bindet ein Agonist an einen GPCR, wird über eine Konformationsstabilisierung des Rezeptors eine Interaktion mit einem intrazellulär gelegenen, heterotrimeren G-Protein möglich. Der aktivierte Rezeptor sorgt für den Austausch von Guanosindiphosphat gegen Guanosintriphosphat an der  $\alpha$ -Einheit des G-Proteins, woraufhin dieses in eine  $G\alpha$ - und eine  $G\beta\gamma$ -Untereinheit zerfällt und je nach GPCR bzw. G-Protein verschiedene Signalwege im Zellinneren aktivieren kann (Weis & Kobilka, 2018). GPCR können aber nicht nur mit G-Proteinen interagieren, sondern bspw. auch mit Arrestin (Rosenbaum et al., 2009). Darüber hinaus zeigen viele GPCR eine Spontanaktivität, für den  $\beta_2$ -Adrenozeptor gezeigt durch Chidiac *et al.* (Chidiac et al., 1994). Liganden können die Rezeptoraktivität somit in beide Richtungen beeinflussen: Agonisten steigern die Aktivität, inverse Agonisten hingegen verringern sie (Weis & Kobilka, 2018).

GPCR werden sowohl in verschiedensten Geweben als auch auf Immunzellen exprimiert (Cabral-Marques & Riemekasten, 2017b). Es konnte gezeigt werden, dass  $\beta$ -Adrenozeptoren nicht nur in diversen Organen wie Herz und Lunge, sondern auch auf vielen Immunzellen exprimiert werden, darunter auch Lymphozyten und Monozyten (Marino & Cosentino, 2013; Yu et al., 2007). Eine Veränderung der adrenergen Einflüsse auf Immunzellen könnte in verschiedenen Erkrankungen relevant sein; so ist eine verminderte Dichte von  $\beta_2$ -Adrenozeptoren auf  $CD8^+$ -Zellen in der RA (Baerwald et al., 1997) sowie auf  $CD19^+$ -B-Zellen in der RA und SSc beschrieben (Wahle et al., 2001).

Auch der Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1 (AT1R) und der Endothelin-Rezeptor Typ A (ETAR), die insbesondere in der Hämodynamik relevant sind, aber auch Einfluss auf Entzündungsprozesse und Fibrosierung zu haben scheinen, werden auf mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMZ) exprimiert (Günther et al., 2014). Günther *et al.* fanden darüber hinaus eine verminderte Dichte des AT1R auf T-Zellen und Monozyten von SSc-PatientInnen sowie eine verminderte Dichte des ETAR auf T-Zellen von SSc-PatientInnen je-

weils im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Günther et al., 2014). Die Datenlage diesbezüglich ist aber teils widersprüchlich: Eine andere Arbeit erbrachte eine erhöhte AT1R- und ETAR-Expression auf Monozyten von SSc-PatientInnen (Rademacher et al., 2016).

Der CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 3, kurz CXCR3, wird insbesondere auf aktivierten T-Zellen, aber auch auf natürlichen Killerzellen und B-Zellen exprimiert und scheint für die Migration dieser Zellen von Bedeutung zu sein (Groom & Luster, 2011). Weigold *et al.* zeigten die Expression von CXCR3 und CXCR4, welcher ebenfalls in der Chemotaxis von Immunzellen eine Rolle spielt (Debnath et al., 2013), sowohl auf T- und B-Zellen als auch auf Monozyten und fanden eine verminderte Expression dieser Rezeptoren auf PBMZ von SSc-PatientInnen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (Weigold et al., 2018). Bei der RZA ist eine hohe Expression des CXCR3 auf Leukozyten in der von der Entzündung betroffenen Gefäßwand beschrieben (Brühl et al., 2005; Graver et al., 2021). Auch in entzündeten Gelenken im Rahmen einer RA finden sich CXCR3- und CXCR4-positive Zellen (Koch, 2005; Nanki et al., 2009).

Ein anderer GPCR, der Protease-aktivierte Rezeptor 2 (PAR2), wird, wenn auch nur in geringem Maße, sowohl von Monozyten als auch von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und natürlichen Killerzellen exprimiert (López et al., 2014). Der PAR2 wird als proinflammatorisch wirksam angesehen und scheint eine wichtige Rolle in chronischen Entzündungen zu spielen, insbesondere auch bei Arthritiden (McIntosh et al., 2020; Tindell et al., 2012). Crilly *et al.* fanden auf Monozyten und T-Zellen des peripheren Blutes von RA-PatientInnen verglichen mit gesunden Kontrollen vermehrt PAR2, bei PatientInnen mit einer hohen Krankheitsaktivität war die PAR2-Expression nochmals erhöht (Crilly et al., 2012).

Der calciumsensitive Rezeptor (CaSR) spielt eine wichtige Rolle im Calciumhaushalt, wird aber nicht nur in der Nebenschilddrüse und Niere exprimiert, sondern, wie als erstes von Yamaguchi *et al.* beschrieben, auch auf Monozyten (Yamaguchi et al., 1998). Wenn auch nicht durchflusszytometrisch auf der Oberfläche anderer PBMZ nachweisbar (Paccou et al., 2013), konnten T. Li *et al.* eine CaSR-Expression von T-Zellen im Western Blot und durch die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion zeigen; zusätzlich ergaben sich Hinweise darauf, dass die CaSR-Aktivierung zu einer erhöhten Zytokinproduktion in T-Zellen führte (T. Li et al., 2013). Jäger *et al.* wiesen eine erhöhte Expression des CaSR in Monozyten von RA-PatientInnen verglichen mit gesunden Kontrollen nach und stellten die Vermutung auf, dass der CaSR über die Aktivierung eines Inflammasoms in Monozyten zur Entzündung in der RA beiträgt (Jäger et al., 2020).

### 1.3 Autoantikörper gegen GPCR

Seit dem letzten Jahrhundert ist bekannt, dass nicht nur spezifische Liganden, sondern auch Autoantikörper an GPCR binden und diese in ihrer Funktion beeinflussen können; mittlerweile werden funktionelle Autoantikörper gegen verschiedenste GPCR in einer Vielzahl von Erkrankungen als relevant angesehen (Cabral-Marques & Riemekasten, 2017b; Meyer & Heidecke, 2018; Wallukat & Schimke, 2014). Antikörper, auch als Immunglobuline (Ig) bezeichnet, werden von Plasmazellen, die sich aus B-Zellen entwickeln, produziert und können in fünf Klassen unterteilt werden: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Die häufigste im Blut vorkommende Klasse ist die der IgG, die wiederum in vier Subtypen unterteilt wird: IgG1 bis IgG4. Ein IgG besteht jeweils aus zwei schweren und zwei leichten Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und so ein Y-förmiges Gesamtmolekül bilden. Die Ketten haben jeweils eine variable Region, die zusammen die Antigenbindungsstelle am sogenannten Fab-Fragment (Fab engl. für *Fragment antigen binding*) bilden. Anteile der konstanten Regionen der schweren Ketten bilden hingegen das Fc-Fragment (Fc engl. für *Fragment crystallisable*) (Bradley, 1974).

2011 wiesen Riemekasten *et al.* erstmals erhöhte Werte für Anti-AT1R- und Anti-ETAR-Autoantikörper bei SSc-PatientInnen nach; hohe Werte dieser Autoantikörper waren darüber hinaus prädiktiv für die krankheitsspezifische Mortalität (Riemekasten *et al.*, 2011). Sowohl in der eben genannten Arbeit als auch in Folgearbeiten konnten Effekte von SSc-IgG mit hohen Anti-AT1R- und Anti-ETAR-Autoantikörper-Titern auf verschiedene Zelltypen gezeigt werden, die auf eine pathophysiologische Relevanz dieser Autoantikörper in der SSc hindeuten (Becker *et al.*, 2014; Günther *et al.*, 2014; Kill *et al.*, 2014; Riemekasten *et al.*, 2011). In Endothelzellen induzierten sie bspw. die Phosphorylierung der extrazellulär-signalregulierten Kinasen 1 und 2 und steigerten die Genexpression des *Transforming growth factor  $\beta$* , ein Zytokin, das u.a. die Kollagensynthese stimuliert (Riemekasten *et al.*, 2011). Außerdem zeigten Endothelzellen nach Stimulation mit SSc-IgG u.a. eine erhöhte Ausschüttung und *messenger* RNA-Expression von Interleukin-8 (Kill *et al.*, 2014). Auch eine erhöhte Interleukin-8-Ausschüttung aus PBMZ, die mit SSc-IgG stimuliert wurden, konnte beobachtet werden (Günther *et al.*, 2014).

Weigold *et al.* fanden darüber hinaus erhöhte Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Autoantikörper-Werte bei dSSc-PatientInnen. Bei PatientInnen, die an einer SSc-assoziierten interstitiellen Lungenerkrankung litten, korrelierten die erhöhten Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Autoantikörper-Werte negativ mit verschiedenen Lungenfunktionsparametern. In Nachfol-

geuntersuchungen zeigte sich jedoch eine Verschlechterung der Lungenfunktion bei PatientInnen mit niedrigen Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Autoantikörper-Werten verglichen mit den PatientInnen, deren Lungenerkrankung stabil blieb (Weigold et al., 2018).

Da aber auch im Serum gesunder Personen Anti-GPCR-Autoantikörper nachweisbar sind, stellten Cabral-Marques *et al.* die Hypothese auf, dass das Vorkommen dieser funktionellen Antikörper physiologisch ist und erst eine Dysregulation mit erhöhten oder auch erniedrigten Werten zur Ausbildung von Autoimmunerkrankungen führen könnte (Cabral-Marques et al., 2018).

## 1.4 Fragestellung

Auch wenn die Forschung mittlerweile tiefe Einblicke in die Pathophysiologie verschiedener Autoimmunerkrankungen wie die SSc, die RZA und die RA erbracht hat, sind die genauen Ursachen und Abläufe häufig noch unklar; auch eine Heilung dieser Erkrankungen ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich.

In der SSc scheinen Autoantikörper, die gegen verschiedene GPCR gerichtet sind, von pathophysiologischer Relevanz zu sein. Diverse GPCR werden auf Immunzellen exprimiert; diese Immunzellen sind u. a. auch durch die Ausschüttung von Zytokinen maßgeblich in die Pathophysiologie vieler chronisch-entzündlicher Autoimmunerkrankungen involviert.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit weiter der Frage nachgegangen, ob Anti-GPCR-Autoantikörper Einfluss auf die Ausschüttung bestimmter Zytokine aus Immunzellen, genauer aus PBMZ, in chronisch-entzündlichen Autoimmunerkrankungen haben. Neben der SSc wurden hier auch die RA und die RZA, welche im Vergleich zur SSc häufiger auftretende Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis sind, betrachtet.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, folgende Fragen für die vorliegende PatientInnenkohorte zu beantworten:

- Finden sich im Serum und/oder in IgG-Fractionen von SSc-, RZA- und RA-PatientInnen veränderte Konzentrationen bestimmter Anti-GPCR-Autoantikörper verglichen mit denen, die im Serum bzw. in IgG-Fractionen gesunder Kontrollen gemessen werden?
- Lassen sich in den Seren von SSc-, RZA- und RA-PatientInnen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe veränderte Zytokinkonzentrationen nachweisen?
- Finden sich in den Überständen von PBMZ, die mit PatientInnen-IgG stimuliert wurden, veränderte Zytokinkonzentrationen im Vergleich zu solchen, die mit IgG gesunder Kontrollen stimuliert wurden?

## 2. Material

### 2.1 PatientInnen

Die PatientInnenserien stammen aus der Serumbank der Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Lübeck. Die Seren wurden nach Abnahme zunächst bei -20 °C eingefroren. Die langfristige Lagerung maximal 3 Wochen nach Blutabnahme erfolgte bei -80 °C.

Ein positives Votum der Ethik-Kommission der Universität zu Lübeck zur Abnahme von Blut zu Forschungszwecken liegt vor (16-199). Die PatientInnen und gesunden Kontrollpersonen erklärten schriftlich ihr Einverständnis.

Tabelle 4. **Charakterisierung der PatientInnen mit Systemischer Sklerose (SSc), n = 16.** Aus einigen der PatientInnen-Seren wurden die Immunglobulin G (IgG)-Fraktionen isoliert. Anschließend erfolgte die Messung ausgewählter Anti-G-Protein-gekoppelter-Rezeptor-Autoantikörper (Anti-GPCR-Ak) in allen Seren und in den aufgereinigten IgG-Fraktionen (siehe fünfte Spalte). Die Messung von Anti-CaSR-Autoantikörpern erfolgte im Unterschied zu den übrigen Autoantikörpern lediglich in den IgG-Eluaten der oberen sechs PatientInnen. Die IgG-Fraktionen der ersten sechs PatientInnen (im oberen Tabellenbereich) wurden nachfolgend in Stimulationsversuchen genutzt. Aufgeführt ist außerdem das C-reaktive Protein (CRP) als Entzündungsparameter. M = männlich, W = weiblich, mg/L = Milligramm/Liter.

<b>Erkrankung</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter (in Jahren)</b>	<b>CRP (in mg/L)</b>	<b>Anti-GPCR-Ak-Messung in</b>
SSc	M	67	2,6	Serum, IgG-Eluat
SSc	M	47	4,6	Serum, IgG-Eluat
SSc	M	44	5,4	Serum, IgG-Eluat
SSc	M	52	22,2	Serum, IgG-Eluat
SSc	M	68	12,3	Serum, IgG-Eluat
SSc	M	59	8,7	Serum, IgG-Eluat
SSc	M	66	5,1	Serum
SSc	M	62	23,7	Serum, IgG-Eluat
SSc	W	64	11,5	Serum, IgG-Eluat
SSc	W	27	9,2	Serum
SSc	W	57	21,7	Serum
SSc	M	67	13,2	Serum, IgG-Eluat

SSc	W	76	10,2	Serum
SSc	W	59	19,1	Serum
SSc	W	57	4,8	Serum, IgG-Eluat
SSc	W	48	26,4	Serum

Einschlusskriterium für die in Tabelle 4 aufgezählten PatientInnen war das Vorliegen einer diffus-kutanen Verlaufsform der SSc, beschrieben unter 1.1.1.3. Außerdem wurden nur PatientInnen eingeschlossen, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme klinisch unter Progredienz litten bzw. sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme in einer aktiven Krankheitsphase befanden. Ausschlusskriterien waren die Therapie mit intravenös verabreichten IgG (IVIg) und/oder Rituximab während des letzten Jahres.

**Tabelle 5. Charakterisierung der PatientInnen mit Riesenzellerarteriitis (RZA), n = 15.** Aus einigen der PatientInnen-Seren wurden die Immunglobulin G (IgG)-Fraktionen isoliert. Anschließend erfolgte die Messung ausgewählter Anti-G-Protein-gekoppelter-Rezeptor-Autoantikörper (Anti-GPCR-Ak) in allen Seren und in den aufgereinigten IgG-Fraktionen (siehe fünfte Spalte). Die Messung von Anti-CaSR-Autoantikörpern erfolgte im Unterschied zu den übrigen Autoantikörpern lediglich in den IgG-Eluaten der oberen sechs PatientInnen sowie der untersten Patientin. Die IgG-Fraktionen der ersten sechs PatientInnen (im oberen Tabellenbereich) wurden nachfolgend in Stimulationsversuchen genutzt. Aufgeführt ist außerdem das C-reaktive Protein (CRP) als Entzündungsparameter. M = männlich, W = weiblich, mg/L = Milligramm/Liter.

<b>Erkrankung</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter (in Jahren)</b>	<b>CRP (in mg/L)</b>	<b>Anti-GPCR-Ak-Messung in</b>
RZA	M	67	10,5	Serum, IgG-Eluat
RZA	W	63	56,3	Serum, IgG-Eluat
RZA	W	63	37,9	Serum, IgG-Eluat
RZA	M	73	25,8	Serum, IgG-Eluat
RZA	W	70	47,3	Serum, IgG-Eluat
RZA	M	63	16,2	Serum, IgG-Eluat
RZA	W	86	21,9	Serum
RZA	W	75	68,3	Serum
RZA	M	67	37,9	Serum, IgG-Eluat
RZA	W	71	13	Serum, IgG-Eluat
RZA	W	79	9,2	Serum, IgG-Eluat

RZA	W	68	7,8	Serum, IgG-Eluat
RZA	W	80	2,5	Serum, IgG-Eluat
RZA	M	79	5,5	Serum, IgG-Eluat
RZA	W	68	20,3	Serum, IgG-Eluat

Einschlusskriterium für die in Tabelle 5 aufgezählten PatientInnen war, dass sich die PatientInnen zum Zeitpunkt der Blutentnahme in einer aktiven Phase der RZA befanden. Darunter fielen PatientInnen, bei denen die Erstdiagnose RZA gestellt wurde sowie PatientInnen, die entweder eine progrediente Symptomatik zeigten oder ein Rezidiv erlitten hatten. Ausschlusskriterien waren erneut die Therapie mit IVIG und/oder Rituximab während des letzten Jahres.

Tabelle 6. **Charakterisierung der PatientInnen mit Rheumatoider Arthritis (RA), n = 15.** Aus einigen der PatientInnen-Seren wurden die Immunglobulin G (IgG)-Fraktionen isoliert. Anschließend erfolgte die Messung ausgewählter Anti-G-Protein-gekoppelter-Rezeptor-Autoantikörper (Anti-GPCR-Ak) in allen Seren und in den aufgereinigten IgG-Fraktionen (siehe fünfte Spalte). Die Messung von Anti-CaSR-Autoantikörpern erfolgte im Unterschied zu den übrigen Autoantikörpern lediglich in den IgG-Eluaten der oberen sechs PatientInnen. Die IgG-Fraktionen der ersten sechs PatientInnen (im oberen Tabellenbereich) wurden nachfolgend in Stimulationsversuchen genutzt. Aufgeführt ist außerdem der *Disease Activity Score 28* (DAS28) bzw. der DAS28 mit C-reaktivem Protein (CRP) als Krankheitsaktivitätsscore. M = männlich, W = weiblich.

<b>Erkrankung</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter (in Jahren)</b>	<b>DAS28</b>	<b>Anti-GPCR-Ak-Messung in</b>
RA	W	35	5,8	Serum, IgG-Eluat
RA	W	66	5,3	Serum, IgG-Eluat
RA	W	57	5,32	Serum, IgG-Eluat
RA	M	41	5,05	Serum, IgG-Eluat
RA	M	65	6,64	Serum, IgG-Eluat
RA	M	67	5,77	Serum, IgG-Eluat
RA	M	38	4,68	Serum, IgG-Eluat
RA	W	50	4,2	Serum, IgG-Eluat
RA	W	42	4,61	Serum, IgG-Eluat
RA	M	56	6,03	Serum, IgG-Eluat
RA	W	62	4,44	Serum

RA	W	72	5,13	Serum, IgG-Eluat
RA	W	76	5,07	Serum
RA	M	53	5	Serum, IgG-Eluat
RA	W	43	5,2 (DAS28- CRP)	Serum

Sämtliche in Tabelle 6 aufgeführten PatientInnen waren zuvor positiv auf den Rheumafaktor getestet worden. Außerdem lag bei ihnen eine mittlere bis hohe Krankheitsaktivität (DAS28 > 4) vor. Bei einer Patientin war statt der Blutsenkungsgeschwindigkeit das CRP mit in die Berechnung geflossen, sodass hier der DAS28-CRP zur Einordnung der Aktivität genutzt wurde. Ausschlusskriterien waren wie bei den anderen PatientInnengruppen die Therapie mit IVIG und/oder Rituximab während des letzten Jahres.

**Tabelle 7. Charakterisierung der gesunden Kontrollen (HC), n = 15.** Aus einigen der Seren wurden die Immunglobulin G (IgG)-Fraktionen isoliert. Anschließend erfolgte die Messung ausgewählter Anti-G-Protein-gekoppelter-Rezeptor-Autoantikörper (Anti-GPCR-Ak) in allen Seren und in den aufgereinigten IgG-Fraktionen (siehe vierte Spalte). Die Messung von Anti-CaSR-Autoantikörpern erfolgte im Unterschied zu den übrigen Autoantikörpern lediglich in den IgG-Eluaten der oberen sechs Personen. Die IgG-Fraktionen der ersten sechs Kontrollpersonen (im oberen Tabellenbereich) wurden nachfolgend in Stimulationsversuchen genutzt. M = männlich, W = weiblich.

<b>Erkrankung</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter (in Jahren)</b>	<b>Anti-GPCR-Ak-Messung in</b>
HC	W	51	Serum, IgG-Eluat
HC	M	53	Serum, IgG-Eluat
HC	W	62	Serum, IgG-Eluat
HC	M	74	Serum, IgG-Eluat
HC	M	48	Serum, IgG-Eluat
HC	M	49	Serum, IgG-Eluat
HC	W	40	Serum, IgG-Eluat
HC	W	49	Serum, IgG-Eluat
HC	M	36	Serum, IgG-Eluat
HC	W	34	Serum, IgG-Eluat
HC	M	76	Serum
HC	W	39	Serum

HC	M	36	Serum, IgG-Eluat
HC	W	53	Serum, IgG-Eluat
HC	W	69	Serum

Das Auswählen einer geschlechts- und altersentsprechenden gesunden Kontrollgruppe war aufgrund der drei heterogenen PatientInnengruppen (SSc, RZA und RA) erschwert.

Tabelle 8. Charakterisierung der gesunden Blut-Spender (HC) zur Gewinnung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMZ). M = männlich, W = weiblich.

Erkrankung	Geschlecht	Alter (in Jahren)	Benutzung für
HC	M	21	ersten Stimulationsversuch
HC	M	30	zweiten Stimulationsversuch
HC	M	26	dritten Stimulationsversuch
HC	W	23	Etablierung

## 2.2 Reagenzien und Puffer

Tabelle 9. Verwendete Reagenzien und Puffer.

Bezeichnung	Hersteller
1x Tris/Glycin/SDS-Puffer	Bio-Rad
4x Laemmli-Puffer	Bio-Rad
7-Aminoactinomycin D	BioLegend
Ampuwa-Wasser Plastipur	Fresenius Kabi
Bindungspuffer:	
20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /150 mM NaCl, pH 7	Merck/J. T. Baker
20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7	Merck
Bio-Safe™ Coomassie stain	Bio-Rad
Biocoll Separating Solution	Biochrom Merck
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAN-Biotech
Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i> , DPBS)	PAN -Biotech Gibco
Elutionspuffer:	
100 mM Glycin/HCl, pH 2,7	Sigma-Aldrich/Carl Roth

Ethanol	Carl Roth
FBS Performance (Fetales Kälberserum, FKS)	Gibco
Human TruStain FcX	BioLegend
Ionomycin	Sigma-Aldrich
Lipopolysaccharide (LPS)	Sigma-Aldrich
Neutralisationspuffer: 1 M Tris/HCl, pH 11	Serva/Carl Roth
Penicillin/Streptomycin	Biochrom Merck
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich
Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standard	Bio-Rad
Precision Plus Protein™ Dual Color Standard	Bio-Rad
Staphylokokken-Enterotoxin-B (SEB)	Sigma-Aldrich
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Zellkulturmedium: RPMI 1640 W/GLUTAMAX™-I	Gibco
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

## 2.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 10. **Verwendete Verbrauchsmaterialien.**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
4 – 15 % Criterion™ TGX™ Precast Gel, 18 Well	Bio-Rad
48-Well-Zellkulturplatten	Sarstedt
7,5 % Criterion™ TGX™ Precast Gel, 18 Well	Bio-Rad
Aluminiumfolie ROTILABO®	Carl Roth
Amicon® Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheit, Molekulargewichtsgrenze 10 kDa	Merck Millipore
Amicon® Ultra-4 Zentrifugen-Filtereinheit, Molekulargewichtsgrenze 100 kDa	Merck Millipore
Glasfaserfilter	Millipore
HiTrap™ Protein G HP, 1 mL	GE Healthcare
Kanülen	Becton Dickinson
LEGENDplex™ Human B Effector 1/2 Panel (9-plex)	BioLegend

LEGENDplex™ Human Inflammation Panel 1 (13-plex)	BioLegend
Lithium-Heparin-S-Monovetten 7,5 mL	Sarstedt
Mikropipettenspitzen	Sarstedt
Mikroreaktionsgefäße	Sarstedt
Neubauer-Zählkammern	NanoEntek
pH-Indikatorstäbchen	Th. Geyer
Probenröhrchen 5 mL für Durchflusszytometrie	Falcon, Corning
Protein G GraviTrap™-Säulen	GE Healthcare
Safety-Multifly-Kanülen 21G	Sarstedt
Serologische Pipetten	Sarstedt
Spritzen	Becton Dickinson
UV-Photometer-Mikroküvetten	BRAND
Zellkulturflaschen	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen 50 mL	Sarstedt

## 2.4 Geräte

Tabelle 11. **Verwendete Geräte.**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
ÄKTA start	GE Healthcare
Analysewaage	Sartorius
BioPhotometer	Eppendorf
Cytoflex S	Beckman Coulter
Elektrophoresekammer: Criterion™ Cell	Bio-Rad
FACS Canto™ II	Becton Dickinson
Gel Doc™ EZ Imager	Bio-Rad
Inkubationsschrank	Binder
Kamera-Adapter AA-P700	JVC
Kühlschrank cooler (4 °C)	Bosch
Kühlschrank economic froster (- 20 °C)	Bosch
Kühlschrank Innova® U360 (- 80 °C)	New Brunswick, Eppendorf
Lichtmikroskop CK2	Olympus

Lichtmikroskop CKX41	Olympus
Magnetrührer RSM – 10HS	Phoenix Instrument
Mikropipetten	Eppendorf
Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann
Plattenvortexmischer GENIUS 3	IKA®
Sicherheitswerkbank Klasse II Typ A/B3	NuAire
Sicherheitswerkbank Safe 2020	Thermo Scientific
Thermomixer 5436	Eppendorf
Tischzentrifuge	Sarstedt
Transformator für Elektrophorese:	
Microcomputer Electrophoresis Power Supply	Consort
Ultraschall-Bad	b-sonic
Vortexmischer REAX 2000	Heidolph Instruments
Wärmewasserbad	GFL
Zentrifuge Allegra™ X-12R	Beckman Coulter
Zentrifuge EBA 12R	Hettich Zentrifugen
Zentrifuge Universal 320R	Hettich Zentrifugen

## 3. Methoden

### 3.1 Isolierung von IgG aus Serumproben mittels Affinitätschromatographie

Die IgG-Isolation erfolgte initial zur Testung der benötigten Puffer mit einer Protein G-Schwerkraftsäule. Anschließend erfolgte die Etablierung der IgG-Isolation mittels *Fast liquid protein chromatography* (FPLC).

#### 3.1.1 IgG-Isolierung mittels Protein G-Schwerkraftsäulen

Aus 500 µL Serum wurden die IgG-Fractionen zunächst mittels einer Protein G-Schwerkraftsäule (Protein G GraviTrap™) isoliert. Hierfür wurde die Serumprobe mit dem Bindungspuffer (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7) 1:4 verdünnt und anschließend für 15 Minuten bei 10000 x g und 4 °C zentrifugiert, um eventuell darin befindliche Zellen abzusenken. Nach der Zentrifugation wurde die Serumprobe mit einer Spritze in ein neues Gefäß überführt, ein möglicherweise vorliegender Lipidfilm wurde verworfen. Nach Äquilibration der Säule mit Bindungspuffer wurde die verdünnte Serumprobe auf die Säule gegeben. Dabei wurden die IgG aus der Probe an das Protein G der Säule gebunden. Ungebundene Stoffe wurden durch die weitere Zugabe von Bindungspuffer ausgewaschen. Anschließend wurde der Elutionspuffer, ein Glycinpuffer pH 2,7, auf die Säule gegeben, um die an das Protein G gebundenen IgG mittels des niedrigen pH-Wertes wieder zu lösen. Das Eluat wurde in einem Gefäß aufgefangen, in das der Neutralisationspuffer (Tris pH 11) vorgelegt worden war. Die direkte Neutralisation des pH-Wertes erfolgte, um die Zeit, in der die IgG dem niedrigen pH-Wert ausgesetzt sind, möglichst gering zu halten. Bei Abweichungen vom Ziel pH von 7 im Eluat wurde weiterer Neutralisationspuffer hinzugefügt. Die Eluate wurden mittels Zentrifugen-Filtereinheiten (Amicon® Ultra-4, Molekulargewichtsgrenze 100 kDa) bei 3000 x g für 15 Minuten bei Raumtemperatur konzentriert. Die IgG-Eluate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Protein G-Säule wurde abschließend mit 20 % Ethanol beladen, um das Wachstum von Mikroorganismen auf der Säule zu verhindern, und verschlossen bei 4 °C gelagert.

#### 3.1.2 IgG-Isolierung mittels *Fast liquid protein chromatography* (FPLC)

Auch die IgG-Isolierung mittels eines automatisierten FPLC-Systems, der ÄKTA start (Gerätename des Herstellers), erfolgte mit einer Protein G-Säule (HiTrap™ Protein G HP). Die Puffer wurden vor Benutzung im Ultraschallbad entgast, um die Entstehung von Gasblasen in der Säule zu verhindern.

Nach Auftauen der Serumproben auf Eis wurden je 900  $\mu\text{L}$  Serum mit 3,7 mL Bindungspuffer (zunächst 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 150 mM  $\text{NaCl}$ , pH 7, im Verlauf Umstellung auf 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7) verdünnt. Anschließend wurden die verdünnten Proben durch einen mit Bindungspuffer benetzten Glasfaserfilter gegeben, um größere Teile wie bspw. Zellen zurückzuhalten, und bis zur Isolierung wieder auf Eis gelegt.

Zunächst wurde die gesamte ÄKTA start zur Entfernung eventuell bestehender Verunreinigungen bzw. Rückstände anderer Puffer mit Ampuwa-Wasser gespült. Danach wurde die Protein G-Säule unter Fluss von Bindungspuffer angeschlossen, um das Eindringen von Luft in die Säule zu verhindern. Die Säule wurde anschließend weiter mit Bindungspuffer gewaschen, bis sich die am Gerät angezeigte Konduktivität, die im Verlauf hinter der Säule gemessen wird, nicht mehr veränderte. Dies zeigte an, dass sich nur noch Bindungspuffer im System befand, Ethanol als Lagerungssubstanz der Säule und Ampuwa-Wasser folglich ausgewaschen waren. Nun wurde die verdünnte Serumprobe über die Säule laufen gelassen. Die ungebundenen Stoffe wurden im Anschluss mittels Bindungspuffer ausgewaschen. Ob noch Proteine ausgewaschen wurden, konnte anhand der am Gerät angezeigten UV-Absorption bei 280 nm beobachtet werden. Im nächsten Schritt wurden dann die IgG durch den Elutionspuffer vom Protein G der Säule gelöst und aufgefangen. Auch hier war Neutralisationspuffer in die jeweiligen Gefäße vorgelegt worden. Die Säule wurde abschließend wieder mit Bindungspuffer gespült, um sie für den nächsten Isolationsvorgang vorzubereiten. Wenn sich in den Eluaten ein pH-Wert von kleiner 7 zeigte, wurde weiterer Neutralisationspuffer hinzugefügt bis pH 7. Nach Aufreinigung der Proben wurde erneut 20 % Ethanol auf die Säule gegeben, die Säule luftdicht verschlossen und bei 4 °C gelagert. Die gesamte ÄKTA start wurde abschließend mit Ampuwa-Wasser gespült.

Die IgG-Eluate wurden in Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl. *Dulbecco's phosphate-buffered saline*, DPBS) umgepuffert, da die Eluate im späteren Verlauf zur Zellstimulation genutzt wurden und DPBS als isotonische Pufferlösung für die Zugabe zur Zellkultur geeignet erschien. Hierzu wurde das Eluat in vorher mit DPBS benetzte Zentrifugeneinheiten (Amicon® Ultra-15, Molekulargewichtsgrenze 10 kDa) gegeben, mit DPBS aufgefüllt und anschließend bei 3000 x g für 15 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Danach erfolgte die erneute Auffüllung des Konzentrats mit DPBS und Zentrifugation mit eben genannten Parametern.

Außerdem erfolgte die Messung der Proteinkonzentration in den IgG-Eluaten. Dafür wurden 50  $\mu\text{L}$  der nun konzentrierten und umgepufferten IgG-Eluate erneut bei 3000 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert, um eventuell vorliegende Präzipitate abzusenken. 7  $\mu\text{L}$  dieses

Eluats wurden anschließend 1:10 mit DPBS verdünnt. Nun wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm und Korrektur nach Warburg am Photometer die Proteinkonzentration im verdünnten Eluat bestimmt. Der Nullabgleich erfolgte mit DPBS.

Die IgG-Eluate wurden bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C gelagert.

Sämtliche IgG-Eluate, in denen im Verlauf der Arbeit die Konzentrationen von verschiedenen Anti-GPCR-Autoantikörpern gemessen wurde bzw. die zur Stimulation von PBMZ genutzt wurden, waren zuvor mittels der ÄKTA start nach eben beschriebenen Vorgehen isoliert worden.

### 3.1.3 Gelelektrophorese

Einige IgG-Eluate wurden nach der Aufreinigung zur Qualitätskontrolle mittels einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) aufgetrennt. Dafür wurden die IgG-Eluate soweit mit DPBS verdünnt, dass sich in jeder genutzten Probe 20 µg IgG befanden. Zu 21 µL der verdünnten Probe wurden anschließend 7 µL Laemmli-Puffer, einmal mit β-Mercaptoethanol, einmal ohne β-Mercaptoethanol je Probe, gegeben. Die Proben wurden im Anschluss für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt, für einige Sekunden in der Tischzentrifuge zentrifugiert und anschließend auf ein Polyacrylamid-Gel (4 - 15 % Criterion™ TGX™ Precast Gel) geladen. Als Marker mit Proteinen bekannter Größe dienten 5 µL Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standard. Die Elektrophorese erfolgte in der Elektrophoresekammer im Tris/Glycin/SDS-Puffer bei 200 V und 120 mA für 40 Minuten. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel mehrfach mit destilliertem Wasser gewaschen und danach für 30 Minuten mit Coomassie-Blau nach Herstellerangaben gefärbt. Im Anschluss wurde das Gel über Nacht erneut in destilliertem Wasser gewaschen, um den Hintergrund wieder zu entfärben. Aufnahmen des Gels erfolgten mit dem Gel Doc™ EZ Imager.

Als nach Isolierung der IgG teilweise sichtbare Präzipitate in den IgG-Eluaten auffielen, wurde erneut eine Elektrophorese mit einem Teil dieser Eluate durchgeführt. Die Eluate wurden zunächst bei 21380 x g (Maximum der Zentrifuge) für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, um die Präzipitate abzusenken. Die Überstände wurden abgenommen und jeweils 18 µL des Überstandes mit 8 µL Laemmli-Puffer, einmal mit β-Mercaptoethanol, einmal ohne β-Mercaptoethanol je Probe, gemischt. Das Pellet wurde in 20 µL Laemmli-Puffer, einmal mit β-Mercaptoethanol, einmal ohne β-Mercaptoethanol je Probe, resuspendiert. Alle Proben wurden anschließend bei 95 °C für 5 Minuten erhitzt, kurz mit der Tischzentrifuge

zentrifugiert und auf ein Polyacrylamid-Gel (7,5 % Criterion™ TGX™ Precast Gel) geladen. Diesmal wurde der Precision Plus Protein™ Dual Color Standard als Marker genutzt. Die Elektrophorese erfolgte im Tris/Glycin/SDS-Puffer bei 150 V und 120 mA für eine Stunde. Nach Waschen des Gels und 30-minütiger Färbung mit Coomassie-Blau wurde das Gel über 30 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Aufnahmen erfolgten wieder mit dem Gel Doc™ EZ Imager.

### **3.2 Isolierung von PBMZ aus Vollblut gesunder SpenderInnen**

Je nach benötigter Zellzahl wurde entsprechend viel Blut (15 bis 30 mL je nach Experiment) eines/einer gesunden Spenders/Spenderin in Lithium-Heparin-Monovetten aus einer Unterarmvene entnommen. Das Blut wurde direkt im Anschluss mit DPBS (Raumtemperatur) gemischt: Bei Experimenten mit 15 mL Blut erfolgte die Zugabe von 10 mL DPBS, bei Experimenten mit 30 mL Blut die Zugabe von 20 mL DPBS. Zur Isolierung der PBMZ wurde nun eine Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll (Biocoll) genutzt: 25 mL der Ficoll-Lösung wurden in ein 50 mL fassendes Zentrifugenröhrchen vorgelegt und vorsichtig, ohne dass es zu einer Vermischung der beiden Flüssigkeiten kam, mit der gleichen Menge an verdünntem Blut überschichtet. Bei Experimenten mit 30 mL Blut wurde dieser Schritt ein zweites Mal durchgeführt. Anschließend wurden die Röhrchen bei 800 x g und Raumtemperatur für 25 Minuten mit langsamer Beschleunigung und ohne Bremse zentrifugiert. Durch die Zentrifugation bildeten sich verschiedene Schichten aus: Die oberste Schicht, überwiegend aus Plasma bestehend, wurde verworfen. Die nächste Schicht ist der sogenannten *buffy coat*, der überwiegend von den PBMZ gebildet wird. Dieser wurde mittels Pipette in ein neues Gefäß überführt und mit Zellkulturmedium, welches vorher im Wasserbad auf 37 °C erwärmt worden war, auf 30 mL aufgefüllt. Nach Zentrifugation bei 650 x g und Raumtemperatur für 7 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Pellet erneut in 20 mL warmen Kulturmedium aufgenommen. Nach erneuter 7-minütiger Zentrifugation bei 650 x g und Raumtemperatur wurde das Pellet erneut resuspendiert und bis zur gewünschten Konzentration mit warmem Kulturmedium verdünnt. Die Zellzahl war zuvor nach dem ersten Waschen mittels einer Neubauer-Zählkammer nach Hinzugabe von Trypanblau bestimmt worden. Im Anschluss wurden die PBMZ unter den dem jeweiligen Experiment entsprechenden Bedingungen in Kultur genommen.

### **3.3 Etablierung des PBMZ-Stimulationsversuches**

#### **3.3.1 Bestimmung der geeigneten Konzentration von Fetalem Kälberserum (FKS) im Zellkulturmedium**

Aus 15 mL heparinisiertem Blut einer gesunden Spenderin wurden nach dem unter 3.2 beschriebenen Protokoll die PBMZ isoliert. Als Zellkulturmedium diente RPMI 1640 plus 1 % Streptomycin/Penicillin. Es wurde eine Zellkonzentration von 2 Millionen/mL eingestellt. Anschließend wurden die Zellen auf eine 48-Well-Platte, 500  $\mu$ L/Well, ausgesät. Zu einigen Ansätzen erfolgte die Zugabe von FKS mit einer Endkonzentration von 10 % in der Kultur, zu anderen mit einer Endkonzentration von 1 %. Zu einigen Ansätzen wurde kein FKS hinzugefügt. Das FKS war zuvor durch die Arbeitsgruppe mittels einer Protein A-Affinitätschromatographie von darin enthaltenen IgG gereinigt und bei 56 °C für eine Stunde hitzeinaktiviert worden. Die Zellen wurden anschließend bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 67 Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die PBMZ mikroskopisch betrachtet.

Zusätzlich erfolgte eine Lebend-Tot-Färbung. Dafür wurde die Zellkultur aus je einem Well in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und mit 500  $\mu$ L DPBS mit 0,5 % Bovinem Serumalbumin (BSA) gemischt. Nach Zentrifugation bei 650 x g und Raumtemperatur für 12 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Pellet resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 1  $\mu$ L 7-Aminoactinomycin D und eine 5-minütige Inkubation im Dunkeln. Anschließend wurde 1 mL DPBS mit 0,5 % BSA hinzugefügt und die Probe erneut bei 650 x g für 6 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes und Resuspension des Pellets in 300  $\mu$ L DPBS mit 0,5 % BSA erfolgte im Probenröhrchen die durchflusszytometrische Messung der Proben am FACS CantoII.

#### **3.3.2 Bestimmung der Versuchsdauer und der Positivkontrolle**

Nach dem unter 3.2 beschriebenen Vorgehen wurden PBMZ aus 30 mL heparinisiertem Blut einer gesunden Spenderin isoliert. Als Zellkulturmedium diente nun RPMI 1640 plus 1 % Streptomycin/Penicillin und 1 % IgG-freies, hitzeinaktiviertes FKS. Die Zellen wurden analog zu 3.4.1 auf einer 48-Well-Platte ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Am Folgetag erfolgte die Zugabe von verschiedenen Reagenzien zu den Ansätzen: Zu einem Teil der Ansätze wurden 10  $\mu$ L eines Fc-Rezeptor-Blockers (Human TruStain FcX) gegeben mit einer sich anschließenden 10-minütigen Inkubationszeit. Danach wurden zu verschiedenen Ansätzen jeweils einzeln die als mögliche Positivkontrollen in Frage kommenden Substanzen in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben: Lipopolysaccharide (LPS, 40 ng/mL und 400 ng/mL), Staphylokokken-Enterotoxin-B (SEB, 100 ng/mL und 1  $\mu$ g/mL),

Phorbol-12-myristat-13-acetat plus Ionomycin (PMA + Iono, 10 ng/mL + 1 µg/mL und 50 ng/mL + 1 µg/mL). Zu einigen Ansätzen erfolgte die Zugabe von IgG eines SSc-Patienten (Konzentration 1 mg/mL). Die Konzentrationen beziehen sich immer auf die Endkonzentration in den Ansätzen. Nach Zugabe der Reagenzien wurden die Zellen erneut bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Stimulantien waren so hinzugegeben worden, dass von jedem Reagens in jeder Konzentration jeweils drei Kulturansätze vorlagen.

Nach 6 Stunden erfolgte die Abnahme der ersten Überstände. Nach Zentrifugation bei 650 x g und 4 °C für 10 Minuten, um enthaltene Zellen abzusenken, wurden die Überstände in ein neues Gefäß überführt und bei – 80 °C eingefroren. Nach 24 bzw. 48 Stunden wurde mit den restlichen Überständen nach dem gleichen Prinzip verfahren.

### **3.4 Kultivierung und Stimulierung von PBMZ**

Zunächst wurden 30 mL Blut eines gesunden Spenders gewonnen, aus welchem dann mittels des unter 3.2 beschriebenen Vorgehens die PBMZ isoliert wurden. Die PBMZ wurden anschließend auf eine Konzentration von 4 Millionen Zellen/mL Kulturmedium gebracht. Als Kulturmedium diente erneut RPMI 1640 plus 1 % Streptomycin/Penicillin und 1 % IgG-freies, hitzeinaktiviertes FKS. Anschließend wurden 250 µL des PBMZ-enthaltenen Mediums pro Well auf einer 48-Well-Platte ausgesät. Ein Well enthielt nach Bestückung folglich 1 Millionen PBMZ. Die Zellen wurden nun bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Am nächsten Morgen erfolgte zunächst die mikroskopische Betrachtung der Zellen und der Sterilkontrollen. Bei qualitativen Zeichen der Vitalität der PBMZ (rund, keine zellfreien Felder erkennbar) und unauffälligen Sterilkontrollen ohne Farbveränderung wurden anschließend die IgG-Eluate, die mittels der ÄKTA start isoliert worden waren, bei Raumtemperatur aufgetaut. Die aufgetauten IgG-Eluate wurden dann bei 3000 x g und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert, um eventuell vorliegende Präzipitate zu senken. Pellets waren nicht sichtbar. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von den IgG-Eluaten jeweils einzeln zu den PBMZ (IgG eines Patienten/einer Patientin bzw. einer gesunden Kontrolle je Well). Da in den IgG-Eluaten verschiedene Proteinkonzentrationen vorlagen, mussten auch verschiedene Mengen der IgG-Eluate zu den PBMZ gegeben werden, um die gleiche Konzentration in der Kultur einzustellen. Um aber insgesamt das gleiche Volumen je Well und damit die gleiche Zelldichte zu erreichen, wurde nach Zugabe der IgG-Eluate so viel auf 37 °C erwärmtes Kulturmedium hinzugegeben, dass jedes Well 500 µL enthielt. Die IgG-Konzentration lag bei 1 mg/mL.

Als Positivkontrolle dienten 10 ng/mL PMA plus 1 µg/mL Ionomycin, die zeitgleich mit den IgG zu anderen Ansätzen gegeben wurden. Auch hier wurden die Ansätze auf ein Volumen von 500 µL aufgefüllt. Die Zellen wurden nach Hinzugabe der Stimulanzen erneut bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Nach 24 Stunden erfolgte, nach unauffälliger mikroskopischer Darstellung der Sterilkontrollen, die Abnahme der Zellkulturüberstände auf Eis. Um enthaltene PBMZ abzusenken, wurden die Überstände bei 1000 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurden die Überstände erneut abgenommen, in neue Gefäße überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei – 80 °C gelagert.

Dieser Versuch wurde in der eben beschriebenen Form insgesamt dreimal mit jeweils den PBMZ eines anderen gesunden Spenders durchgeführt.

### **3.5 Messung von Anti-GPCR-Autoantikörpern in Serum und IgG-Eluaten**

Die Bestimmung der Konzentrationen folgender Anti-GPCR-Autoantikörper erfolgte in Kooperation mit der Firma CellTrend (CellTrend GmbH, Luckenwalde): Anti-AT1R-, Anti-ETAR-, Anti-PAR2-, Anti-CaSR-, Anti-β<sub>1</sub>-Adrenozeptor-, Anti-β<sub>2</sub>-Adrenozeptor-, Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Autoantikörper. Die eingefrorenen Proben wurden auf Trockeneis transportiert. Die Konzentrationsmessungen erfolgten mittels kommerzieller *Enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA). Die Konzentrationen der verschiedenen Anti-GPCR-Autoantikörper werden in der Einheit Units/mL als Ausdruck für eine willkürliche Einheit (engl. *arbitrary unit*) angegeben.

### **3.6 Messung von Zytokinen in den Überständen des Stimulationsversuches und in zugehörigen Seren**

Die Messung ausgewählter Zytokine in den Überständen aus den PBMZ-Stimulationsversuchen bzw. in den zugehörigen Seren erfolgte mittels Legendplex, einem kommerziellen Bead-basierten Immunassay.

Für die Überstände des Etablierungsversuches, beschrieben in 3.3.2, wurde der Legendplex mit dem Human Inflammation Panel 1 genutzt, mit welchem die folgenden Zytokine bestimmt wurden: Interleukin-1β, Interferon-α<sub>2</sub>, Interferon-γ, Tumornekrosefaktor-α, CC-Chemokin-Ligand-2, Interleukin-6, Interleukin-8, Interleukin-10, Interleukin-12p70, Interleukin-17A, Interleukin-18, Interleukin-23 und Interleukin-33.

Für die Überstände der drei PBMZ-Stimulationsversuche, beschrieben unter 3.4, und die Serumproben der PatientInnen bzw. der gesunden Kontrollen, deren IgG zu Stimulation genutzt worden waren, wurde das Human B Effector 1/2 Panel zur Messung der folgenden Zytokine genutzt: Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , Tumornekrosefaktor- $\beta$ , Interleukin-2, Interleukin-4, Interleukin-6, Interleukin-12p70, Interleukin-13, Interleukin-17A und Interferon- $\gamma$ .

Es wurde in beiden Fällen mit einer V-Boden-Platte gearbeitet. Der Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurde lediglich die Menge der Reagenzien von 25  $\mu$ L auf 12,5  $\mu$ L reduziert, da auch diese Menge zur Messung am Durchflusszytometer ausreichte. Die Zentrifugation erfolgte mit 500 x g. Die Messung der Zytokine erfolgte beim Etablierungsversuch sowohl am Cytoflex als auch am FACS CantoII. Da sich nach der Messung am Cytoflex Probleme mit der Software des Legendplex während der Auswertung ergaben, wurden die Messungen für die Stimulationsversuche und Seren am FACS CantoII vorgenommen. Die Auswertung erfolgte mit der von BioLegend bereitgestellten Software.

### 3.7 Statistische Analyse

Es erfolgte eine statistische Beratung am Institut für Medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck in zwei Terminen. Hierbei wurde insbesondere die Planung und Auswertung der drei Stimulationsversuche diskutiert. Die Auswertung erfolgte unter Beachtung der Hinweise aus der statistischen Beratung selbstständig.

Zur statistischen Analyse wurde GraphPad Prism Version 9 und 10 genutzt. Die Messwerte der Anti-GPCR-Autoantikörper und der Zytokine in den Seren und Überständen wurden als nicht-normalverteilt eingestuft. Aus diesem Grund kam bei der Auswertung zunächst jeweils der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test als Globaltest zur Anwendung. Zeigte der Kruskal-Wallis-Test an, dass sich für den jeweiligen Antikörper bzw. das Zytokin ein signifikanter Unterschied zwischen den Erkrankungsgruppen bzw. der Gruppe der gesunden Kontrollen ergab, wurden die vier Gruppen untereinander mittels des *Dunn's Multiple Comparison-Tests* als Post-hoc-Test verglichen. Die Korrelationsuntersuchungen der Anti-GPCR-Autoantikörper erfolgten mittels der Rangkorrelationsanalyse nach Spearman.

Da es bei den Stimulationsversuchen, bei denen PBMZ von drei gesunden Spendern mit den IgG derselben PatientInnen einzeln stimuliert worden waren, zu Unterschieden zwischen den Spendern für alle Zytokine unabhängig von den IgG kam, wurden die drei Versuche jeweils einzeln analysiert.

Als signifikant wurden p-Werte  $< 0,05$  betrachtet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Etablierung der IgG-Isolation mittels Affinitätschromatographie

Um im späteren Verlauf PBMZ mit IgG stimulieren zu können, wurden zunächst die für die IgG-Isolation aus humanem Serum benötigten Puffer getestet. Dies erfolgte mittels einer Protein G-Schwerkraftsäule, welche mit rekombinantem Protein G bepackt ist, das nach Herstellerangaben spezifisch an die Fc-Region von IgG bindet.

Zwei der mit der Protein G-Säule aufgereinigten IgG-Eluate wurden im Anschluss mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt. Dies diente der Überprüfung, ob die Aufreinigung insoweit erfolgreich war, als dass sich in den Eluaten Proteine mit einer IgG-entsprechenden Molekülmasse befinden. Bei der SDS-PAGE bindet das negativ geladene und denaturierende SDS an die Proteine in der Probe, wodurch alle Proteine nach außen hin eine negative Ladung zeigen; lässt man die Proben anschließend elektrophoretisch durch ein Polyacrylamidgel laufen, werden die Proteine einzig nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt, nicht nach ihrer elektrischen Ladung (Nowakowski et al., 2014). Zu einzelnen Proben wurde zusätzlich  $\beta$ -Mercaptoethanol hinzugegeben, welches als Reduktionsmittel Disulfidbrücken aufbricht (Mthembu et al., 2020). Das führte dazu, dass die schweren (etwa 50 kDa) von den leichten Ketten (etwa 25 kDa) eines IgG-Moleküls gelöst wurden und so getrennt voneinander im Gel liefen. Ohne Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol liefen die IgG-Moleküle mit einer Masse von etwa 150 kDa als Ganzes im Gel. Nach Anfärbung des Gels mit Coomassie-Blau, einem Farbstoff, der unspezifisch Proteine anfärbt, zeigten sich den eben genannten Molekülmassen entsprechende spezifische Banden für IgG (Abb. 1). Allerdings waren auch Proteine mit anderen Massen erkennbar, sodass das Waschvolumen erhöht wurde.

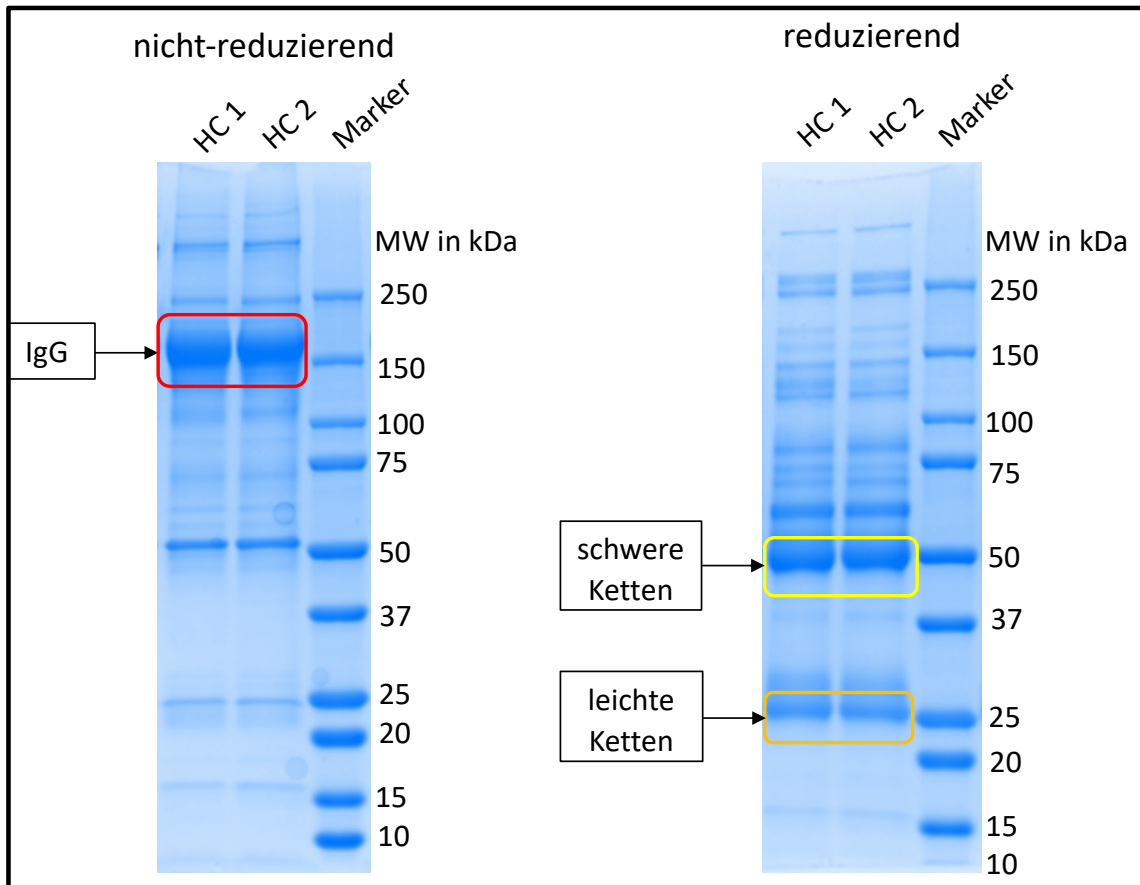


Abbildung 1. **Immunglobulin G (IgG)-spezifische Banden nach SDS-PAGE der IgG-Eluate erkennbar.** Die auf das Gel geladenen IgG-Eluate wurden aus jeweils zwei Serumproben von gesunden Kontrollen (HC 1 und HC 2) isoliert. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen zeigte sich nach Färbung mit Coomassie-Blau eine Bande bei 150 kDa, entsprechend der Molekülmasse eines IgG-Moleküls (roter Kasten). Unter reduzierenden Bedingungen, erreicht durch Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol, liefen die leichten (25 kDa, oranger Kasten) und schweren Ketten (50 kDa, gelber Kasten) der IgG getrennt voneinander im Gel. MW in kDa = Molekülmasse in Kilodalton, SDS-PAGE = Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese.

Anschließend wurde ein Protokoll zur Isolation von IgG aus humanem Serum mit der ÄKTA start, einem FPLC-System, etabliert. Es wurde wieder eine Protein G-Säule genutzt. Abbildung 2 zeigt die von der ÄKTA start gemessene UV-Absorption bei 280 nm im Verlauf der Isolation von IgG aus einer Serumprobe. Bei 280 nm haben gelöste Proteine ihr Absorptionsmaximum. Nach Auffangen der IgG-Fraktion und elektrophoretischer Auftrennung dieser nach ihrem Molekulargewicht mittels einer SDS-PAGE, in Analogie zum Versuch mit der Schwerkraftsäule, konnte das in Abbildung 1 dargestellte Ergebnis reproduziert werden (unter reduzierenden Bedingungen gezeigt in Abb. 3).

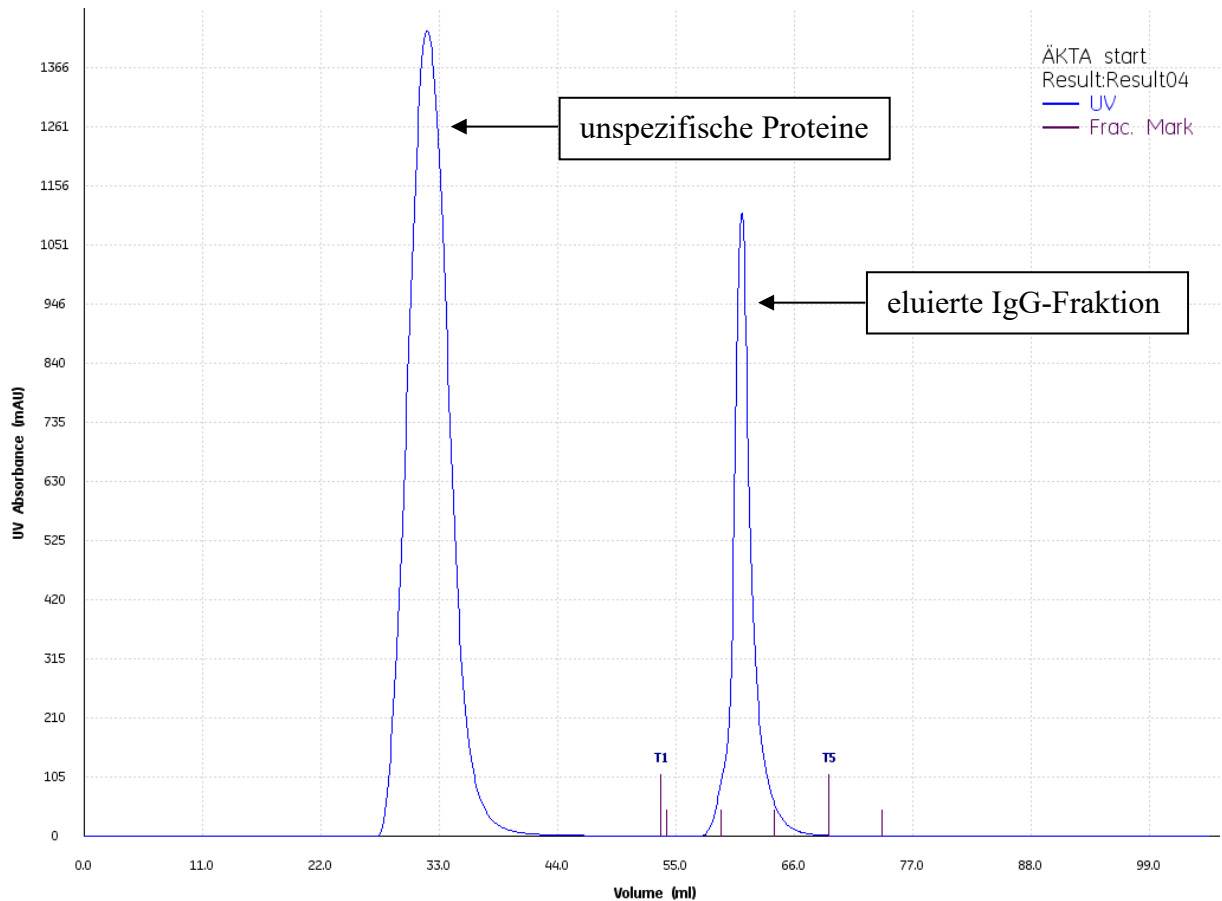


Abbildung 2. UV-Absorption gemessen von der ÄKTA start während der Immunglobulin G (IgG)-Aufreinigung aus einer Serumprobe. Aufgetragen ist die Absorption bei 280 nm gegen das durchgelaufene Volumen. Die Messung der Absorption erfolgte in einer UV-Zelle, die im Verlauf hinter der Protein G-Säule sitzt. Zu Beginn wurde die Probe geladen, anschließend mit einem Phosphatpuffer pH 7 gespült. Der erste Peak (28 – 42 mL) entspricht den unspezifischen Proteinen, die nicht an Protein G binden. Nach Auswaschen dieser Proteine wurden die an Protein G-gebundenen IgG mit einem Glycinpuffer pH 2,7 eluiert (zweiter Peak, 58 – 68 mL) und fraktioniert gesammelt. Frac. Mark zeigt die aufgefangenen Fraktionen des IgG-Eluats T1 bis T6 an. mAU = *milli-Absorbance Unit*, ml = Milliliter, nm = Nanometer.

Die Isolierung der IgG-Fractionen, die im weiteren Verlauf der Arbeit genutzt wurden, erfolgte mittels der ÄKTA start; durch die Sichtbarmachung der aktuellen UV-Absorption am Gerät und der sich daraus ergebenden Möglichkeit, die Waschvolumina entsprechend anzupassen, kann von einer Reduktion der Verunreinigung der IgG-Eluate durch andere Proteine im Vergleich zur Nutzung der Protein G-Schwerkraftsäule ausgegangen werden.

In einem Teil der IgG-Eluate waren nach der Aufreinigung und Umpufferung in DPBS Präzipitate sichtbar geworden. Der Frage nachgehend, um was es sich bei den Präzipitaten handelt, wurden Proben mit sichtbaren Aggregaten zentrifugiert, sodass die Überstände abgenommen werden konnten und ein Pellet zurückblieb. Anschließend wurden die Überstände

und die in Laemmli-Puffer resuspendierten Pellets getrennt voneinander auf ein Gel geladen und mit einer SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 3). In den Überständen und Pellets zeigten sich jeweils Banden mit den gleichen Molekülmassen. Aufgrund der Molekülmassen könnte es sich bei den ausgefallenen Proteinen um IgG handeln.

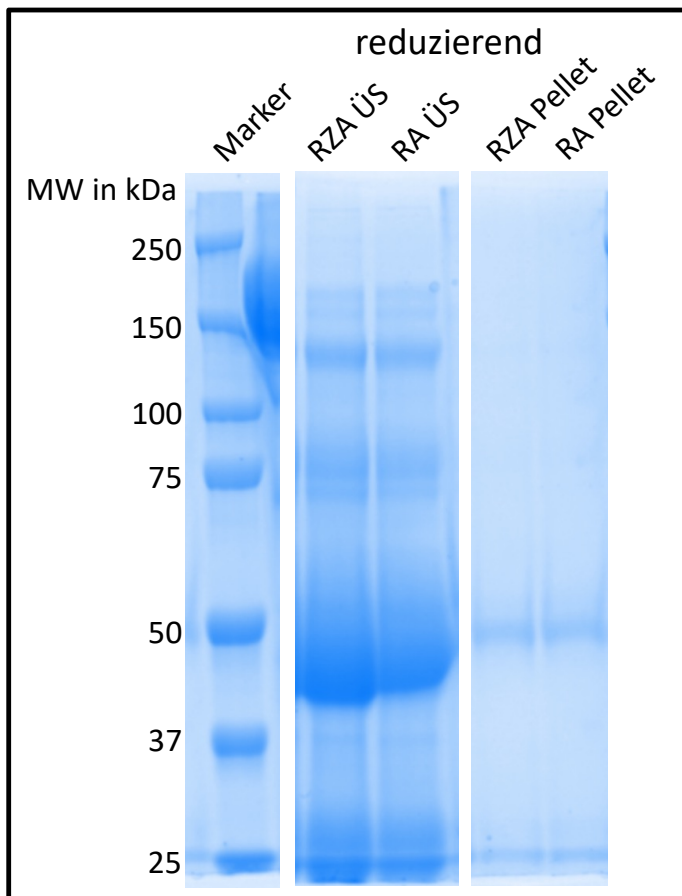


Abbildung 3. **Immunglobulin G (IgG)-spezifische Banden nach SDS-PAGE der Überstände und Präzipitate aus zwei IgG-Eluaten erkennbar.** Es wurden die Überstände der IgG-Eluate (ÜS) und die in Laemmli-Puffer resuspendierten Pellets (Pellet) aufgetragen. Jeweils bei 50 kDa (schwere Ketten eines IgG-Moleküls) und bei 25 kDa (leichte Ketten eines IgG-Moleküls) ließen sich unter reduzierenden Bedingungen Banden sowohl in den Überständen als auch in den resuspendierten Präzipitaten anfärben. MW in kDa = Molekülmasse in Kilodalton, RZA = IgG aus Serum eines/einer Patienten/Patientin mit Riesenzellarteriitis, RA = IgG aus Serum eines/einer Patienten/Patientin mit Rheumatoider Arthritis, SDS-PAGE = Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese.

## 4.2 Etablierung der Kultivierungsbedingungen der PBMZ

Um mittels eines Stimulationsversuches der Frage nachzugehen, ob die in den IgG-Fraktionen enthaltenen Anti-GPCR-Autoantikörper einen Einfluss auf die Zytokinausschüttung von

PBMZ haben, musste zuerst die Kultivierung der PBMZ und die Stimulierung der PBMZ mit IgG etabliert werden.

#### **4.2.1 1 % FKS im Kulturmedium als geeignete Konzentration zur Kultivierung von PBMZ bestimmt**

Zunächst wurde der Einfluss der FKS-Konzentration im Kulturmedium auf das Überleben der PBMZ *in vitro* über die Dauer des Stimulationsversuches untersucht. Dafür wurde Blut einer gesunden Spenderin gewonnen. Aus diesem wurden direkt im Anschluss die PBMZ mittels einer Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Anschließend wurden die PBMZ in verschiedenen Ansätzen ohne Zugabe von FKS, mit Zugabe von FKS mit einer Endkonzentration von 1 % und mit Zugabe von FKS mit einer Endkonzentration von 10 % im Kulturmedium inkubiert. Nach 67 Stunden stellten sich die PBMZ mikroskopisch wie in Abbildung 4 gezeigt dar. Im Ansatz ohne FKS waren vermehrt Bereiche ohne Zellen zu erkennen (Abb. 4 A). In den Ansätzen mit FKS waren die Zellen rund und proliferierend (Abb. 4 B und C).

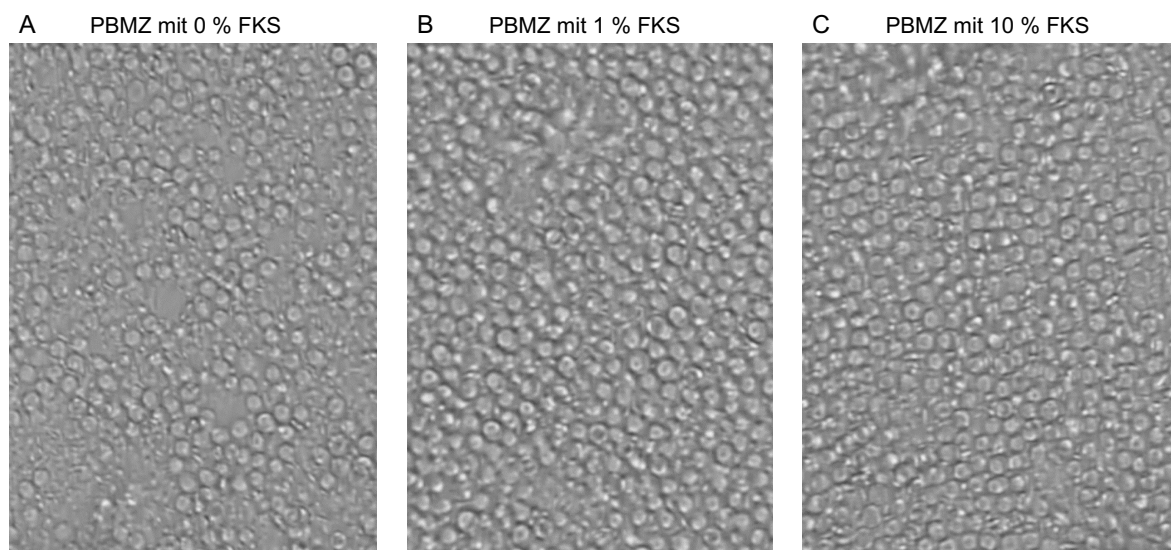


Abbildung 4. **Unterschiede in mikroskopischen Aufnahmen der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMZ) nach 67-stündiger Kultivierung ohne Zugabe von Fetalem Kälberserum (FKS) (A), mit 1 % FKS (B) und mit 10 % FKS im Kulturmedium (C). Aufnahme in 40-facher Vergrößerung.**

Zur Quantifizierung der Vitalität wurden die PBMZ nach 67 Stunden in Kultur mit unterschiedlichen FKS-Konzentrationen zusätzlich mit dem Avitalfarbstoff 7-Aminoactinomycin D gefärbt, der nur in Zellen ohne intakte Zellwand eindringen kann und somit spezifisch tote

Zellen anfärbt (Schmid et al., 1992). Die Zellen wurden nachfolgend durchflusszytometrisch zunächst mittels des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichts dargestellt, sprich anhand ihrer Größe und ihrer Granularität differenziert (Abb. 5).

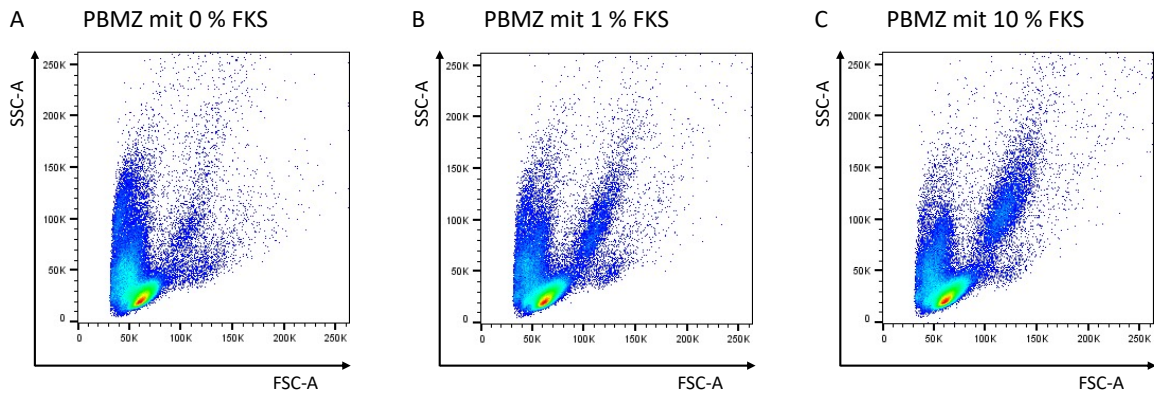


Abbildung 5. **Durchflusszytometrische Darstellung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMZ).** Die Differenzierung erfolgte anhand des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichts nach 67-stündiger Kultivierung mit jeweils unterschiedlichen Mengen von zur Kultur gegebenem Fetalem Kälberserum (FKS, 0 % in A, 1 % in B, 10 % in C). SSC-A = Seitwärtsstreulicht (engl. *side scatter*), FSC-A = Vorwärtsstreulicht (engl. *forward scatter*).

Anschließend wurde der Anteil von mit 7-Aminoactinomycin D angefärbten Zellen gemessen (Abb. 6). Im Ansatz ohne FKS waren 93,1 % der Zellen vital, mit 1 % FKS im Kulturmedium 94,9 % und mit 10 % FKS in Kulturmedium 96,6 % der Zellen.

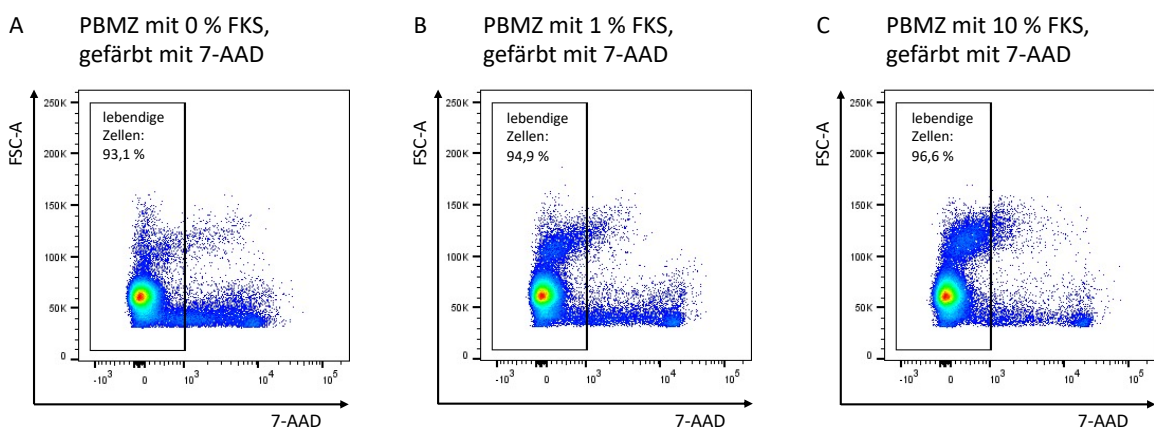


Abbildung 6. **Über 90 % der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMZ) nach 67-stündiger Kultivierung vital.** Durchflusszytometrische Messung nach Anfärbung der PBMZ mit 7-Aminoactinomycin D (7-ADD) nach 67 Stunden Kultivierung mit jeweils unterschiedlichen Mengen von zur Kultur gegebenem Fetalem Kälberserum (FKS, 0 % in A, 1 % in B und 10 % in C als Endkonzentration im Kulturmedium). FSC-A = Vorwärtsstreulicht (engl. *forward scatter*).

Da auch im FKS, aus dem zuvor die IgG isoliert wurden, immer noch geringe Mengen von IgG enthalten sein können und es sich allgemein um ein Naturprodukt handelt, sind Beeinflussungen der Zellen durch das FKS nicht auszuschließen. Andererseits stellten sich im mikroskopischen Bild im Ansatz ohne FKS zellfreie Bereiche und eine veränderte Morphologie der PBMZ dar (Abb. 4 A), sodass nicht gänzlich auf die Zugabe von FKS verzichtet werden wollte. Aus diesen Gründen wurde als Endkonzentration von FKS im Zellkulturmedium 1 % festgelegt.

#### **4.2.2 PMA plus Ionomycin eignet sich als Positivkontrolle im Stimulationsversuch über 24 Stunden**

Es wurden erneut PBMZ einer gesunden Spenderin in Kultur genommen und anschließend mit verschiedenen Reagenzien stimuliert ( $n = 1$ ). Ziel dieses Versuches war zum einem die Bestimmung einer Substanz, nach deren Zugabe zur Kultur die PBMZ große Mengen der im Anschluss gemessenen Zytokine ausschütten, und die somit als Positivkontrolle geeignet ist. Zum anderen sollte durch Vergleich von verschieden langen Stimulationszeiträumen der Zeitpunkt bestimmt werden, an dem die Zytokinkonzentrationen in den Überständen möglichst hoch sind. Sechs, 24 und 48 Stunden nach Zugabe der Reagenzien wurden jeweils die Überstände der PBMZ abgenommen und im Anschluss die Konzentrationen verschiedener Zytokine mittels Legendplex als Doppelwerte (technische Replikate) gemessen, exemplarisch gezeigt für Interleukin-6 in Abbildung 7. Bei der Messung von Interleukin-6 lagen mehrere Werte unterhalb der unteren Nachweisgrenze von 0,67 pg/mL: einer der beiden Doppelwerte für PBMZ in Medium nach sechs Stunden, beide Doppelwerte jeweils für PBMZ in Medium nach 24 und 48 Stunden und beide Doppelwerte für Medium. Vergleicht man die gemessene Konzentration von Interleukin-6 nach Stimulation mit LPS, SEB und PMA plus Ionomycin, zeigten sich die höchsten Werte bei PMA plus Ionomycin nach 24 und 48 Stunden (Abb. 7 A). Hohe Zytokinkonzentrationen in den Überständen 24 und 48 Stunden nach Stimulation mit PMA plus Ionomycin zeigten sich auch für Interferon- $\gamma$ , den Tumornekrosefaktor- $\alpha$  und Interleukin-17A (Daten nicht gezeigt), sodass PMA 10 ng/mL plus Ionomycin 1  $\mu$ g/mL als Positivkontrolle für die Stimulation von PBMZ gewählt wurde. Zu einigen Ansätzen war TruStain, ein Fc-Rezeptor-Blocker, der im Rahmen von Fluoreszenzfärbungen Anwendung findet, hinzugefügt worden. Durch diesen Blocker wird die Bindung eines Antikörpers mit seinem Fc-Fragment an Fc-Rezeptoren auf Zellen verhindert. Über diese Bindung ist auch eine Aktivierung von Immunzellen möglich, welche zu einer unspezifischen Zytokinausschüttung führen könnte (Nimmerjahn & Ravetch, 2008). Bei der Stimulation von PBMZ mit IgG von PatientInnen ist aber gerade der Effekt von Anti-GPCR-

Autoantikörpern an ihren spezifischen Rezeptor von Interesse, sodass der Einsatz des Fc-Rezeptor-Blockers in Erwägung gezogen wurde. Im Versuch zeigte sich jedoch, dass bereits die alleinige Zugabe von TruStain zur PBMZ-Kultur zu einer Zytokinausschüttung führte (Abb. 7 B). Aus diesem Grund wurde TruStain im weiteren Verlauf nicht verwendet.

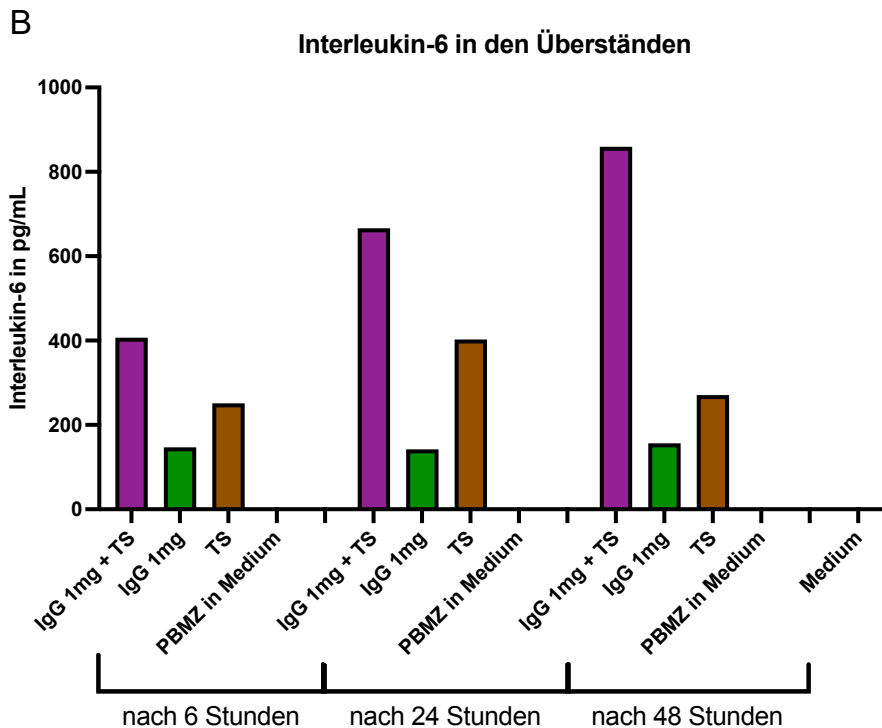
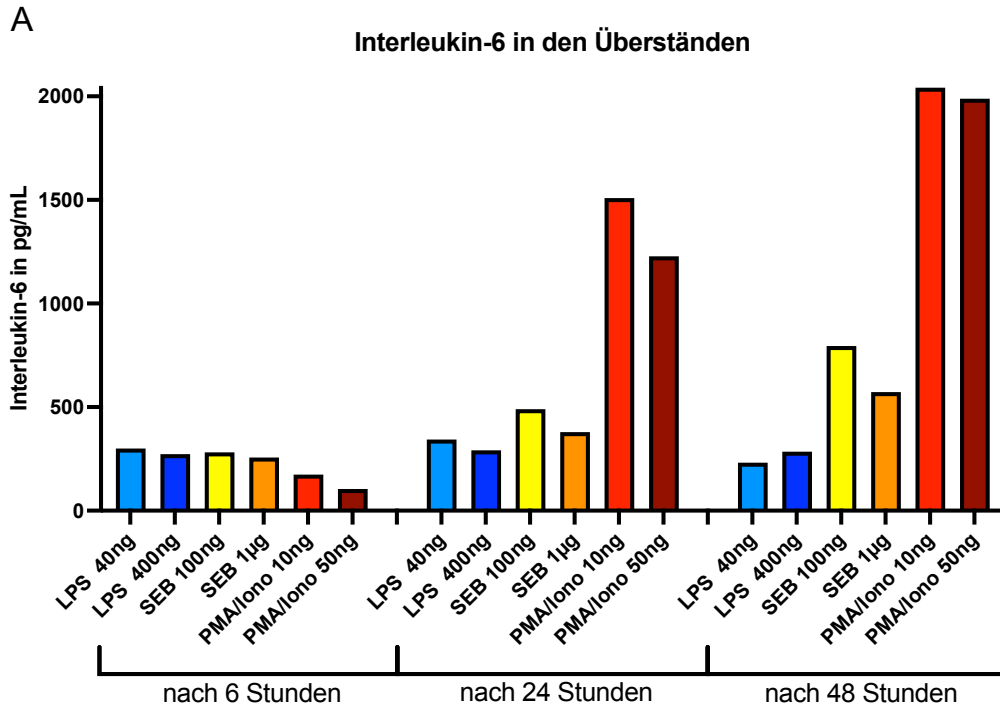


Abbildung 7. **Konzentration von Interleukin-6 gemessen in den Überständen nach Stimulation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMZ) mit PMA plus Ionomycin nach 24**

**und 48 Stunden am höchsten (A); Zytokinausschüttung durch alleinige Zugabe von TruStain (B).** Aufgeführt ist jeweils die Konzentration von Interleukin-6 in den Überständen nach Stimulation von PBMZ mit verschiedenen Reagenzien über unterschiedlich lange Zeiträume gemessen mittels Legendplex. Gezeigt ist der Median der Doppelwerte.  $n = 1$ . Massenangaben auf der x-Achse jeweils pro Milliliter. Untere Nachweisgrenze für Interleukin-6: 0,67 pg/mL. LPS = Lipopolysaccharide, SEB = Staphylokokken-Enterotoxin-B, PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat, Iono = Ionomycin, IgG = IgG eines/einer Patienten/Patientin mit SSc, TS = TruStain. pg/mL = Pikogramm/Milliliter, ng = Nanogramm,  $\mu\text{g}$  = Mikrogramm, mg = Milligramm.

Bei Auswahl des Zeitpunktes zur Überstandsabnahme wurden folgende Punkte berücksichtigt: Nach sechs Stunden Stimulation war auch bei den Positivkontrollen kein Interleukin-17A in den Überständen nachweisbar, nach 24 und 48 Stunden hingegen schon; die Konzentration des Tumornekrosefaktors- $\alpha$  war nach 48-stündiger Stimulation mit IgG im Vergleich zur sechs- und 24-stündigen Stimulation aber bereits stark abgefallen (Daten nicht gezeigt). Schlussfolgernd wurde als Zeitpunkt für die Abnahme der Überstände 24 Stunden nach Zugabe der Stimulantien gewählt.

### **4.3 Veränderte Anti-GPCR-Autoantikörper-Konzentrationen in Seren und IgG-Fraktionen von PatientInnen mit SSc**

In den Seren der unter 2.1 aufgelisteten PatientInnen bzw. der gesunden Kontrollen wurden in Kooperation mit der Firma CellTrend Konzentrationen von Autoantikörpern gemessen, die gegen folgende GPCR gerichtet sind: AT1R, ETAR, PAR2, CaSR,  $\beta_1$ -Adrenozeptor,  $\beta_2$ -Adrenozeptor, CXCR3 und CXCR4. Die Konzentrationen dieser Anti-GPCR-Autoantikörper wurden auch in den zuvor mittels Affinitätschromatographie aufgereinigten IgG-Fraktionen gemessen.

Dabei fanden sich erhöhte Konzentrationen von Autoantikörpern, die gegen den  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Adrenozeptor gerichtet sind, in den Seren von SSc-PatientInnen im Vergleich zu den anderen Gruppen bestehend aus Seren von PatientInnen mit RZA und RA und Seren gesunder Kontrollen (Abb. 8 A und B). Das gleiche Bild zeigte sich auch in den aus diesen Seren aufgereinigten IgG-Fraktionen (Abb. 9 A und B).

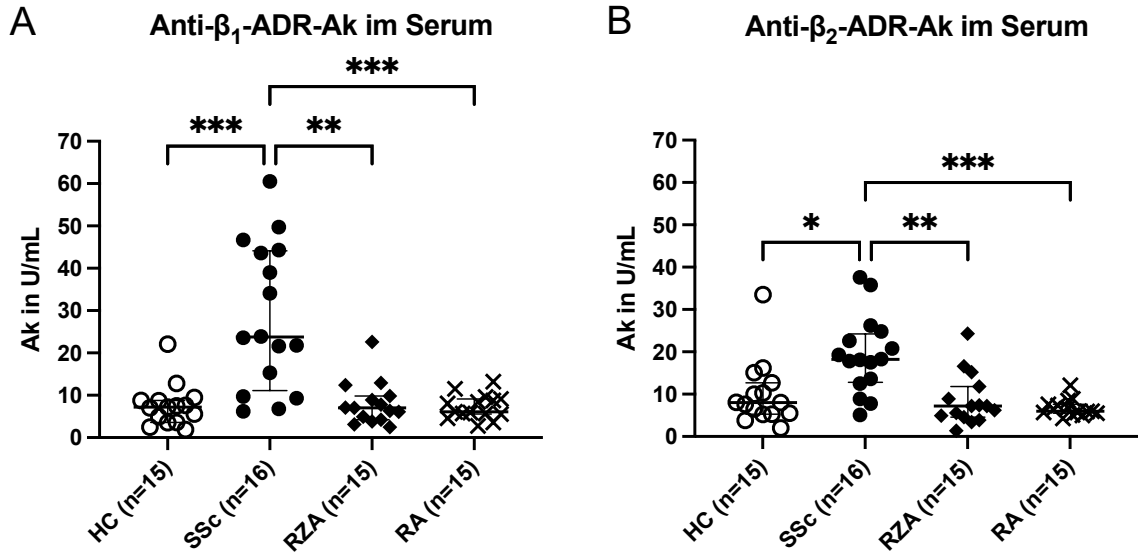


Abbildung 8. Erhöhte Konzentrationen von gegen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Adrenozeptoren (ADR) gerichteten Autoantikörpern (Ak) in Seren von PatientInnen mit Systemischer Sklerose (SSc) im Vergleich zu Seren gesunder Kontrollen (HC) und Seren von PatientInnen mit Riesenzellarteriitis (RZA) und Rheumatoider Arthritis (RA). Gezeigt sind der Median und der Interquartilsabstand. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . U/mL = Units/Milliliter.

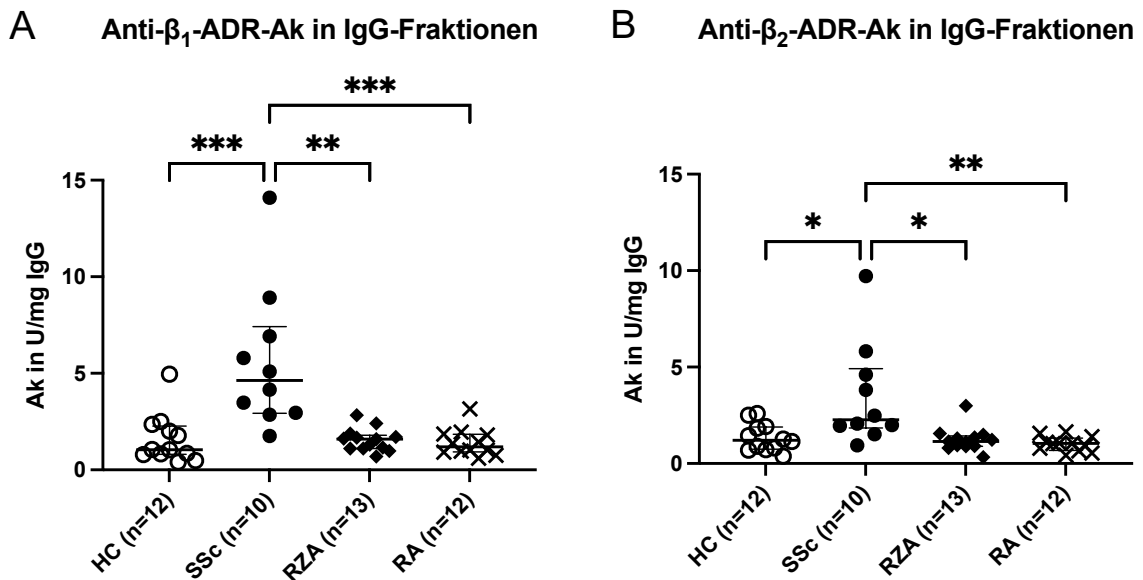


Abbildung 9. Erhöhte Anti- $\beta_1$ - und Anti- $\beta_2$ -Adrenozeptor (ADR)-Autoantikörper (Ak)-Konzentrationen in aufgereinigten Immunglobulin G (IgG)-Fractionen aus Seren von PatientInnen mit Systemischer Sklerose (SSc) im Vergleich zur Gruppe der gesunden Kontrollen (HC) und der PatientInnen mit Riesenzellarteriitis (RZA) und Rheumatoider Arthritis (RA). Gezeigt sind der Median und der Interquartilsabstand. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . U/mg IgG = Units/Milligramm IgG.

Die Konzentrationen der in den Seren gemessenen Anti- $\beta_1$ -Adrenozeptor-Autoantikörpern korrelierten positiv mit den Anti- $\beta_1$ -Adrenozeptor-Autoantikörpern, die in den jeweils aus diesen Seren isolierten IgG-Fractionen bestimmten worden waren (Abb. 10). Auch die Anti- $\beta_2$ -Adrenozeptor-Autoantikörper aus Seren und den zugehörigen IgG-Fractionen zeigten eine positive Korrelation (Abb. 11).

**Korrelation zwischen Anti- $\beta_1$ -ADR-Ak im Serum und in den zugehörigen IgG-Fractionen von SSc-, RZA- und RA-PatientInnen sowie gesunden Kontrollen**

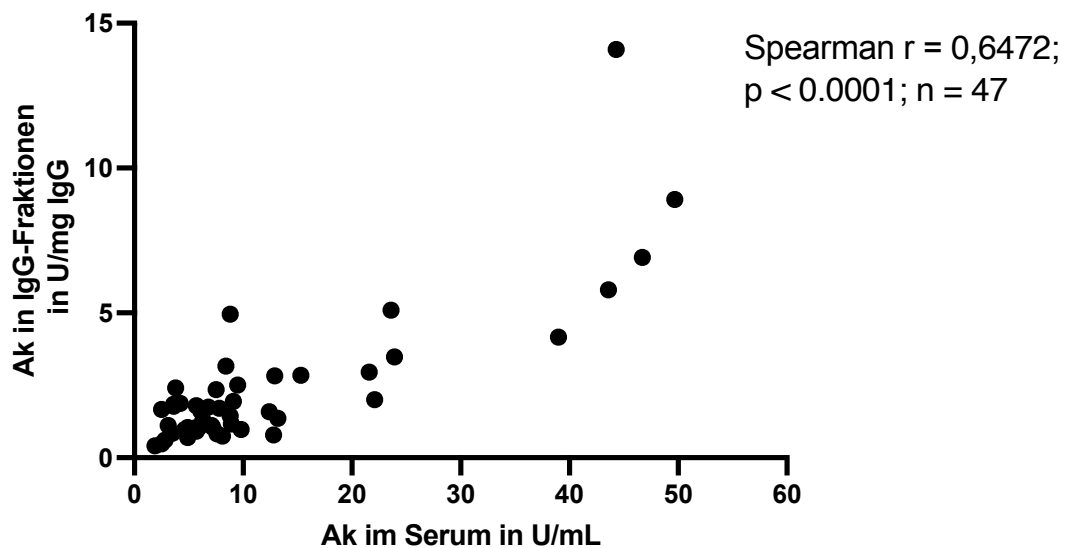


Abbildung 10. Positive Korrelation zwischen den im Serum und in den zugehörigen Immunglobulin G (IgG)-Fraktionen bestimmten Anti- $\beta_1$ -Adrenozeptor (ADR)-Autoantikörpern (Ak) bei PatientInnen mit Systemischer Sklerose (SSc), Riesenzellerteriitis (RZA) und Rheumatoider Arthritis (RA) sowie gesunden Kontrollen. Korrelationskoeffizient nach Spearman  $r = 0,6472$ ,  $p < 0,0001$ . U/mg IgG = Units/Milligramm IgG, U/mL = Units/Milliliter.

**Korrelation zwischen Anti- $\beta_2$ -ADR-Ak im Serum und in den zugehörigen IgG-Frak-tionen von SSc-, RZA- und RA-PatientInnen sowie gesunden Kontrollen**

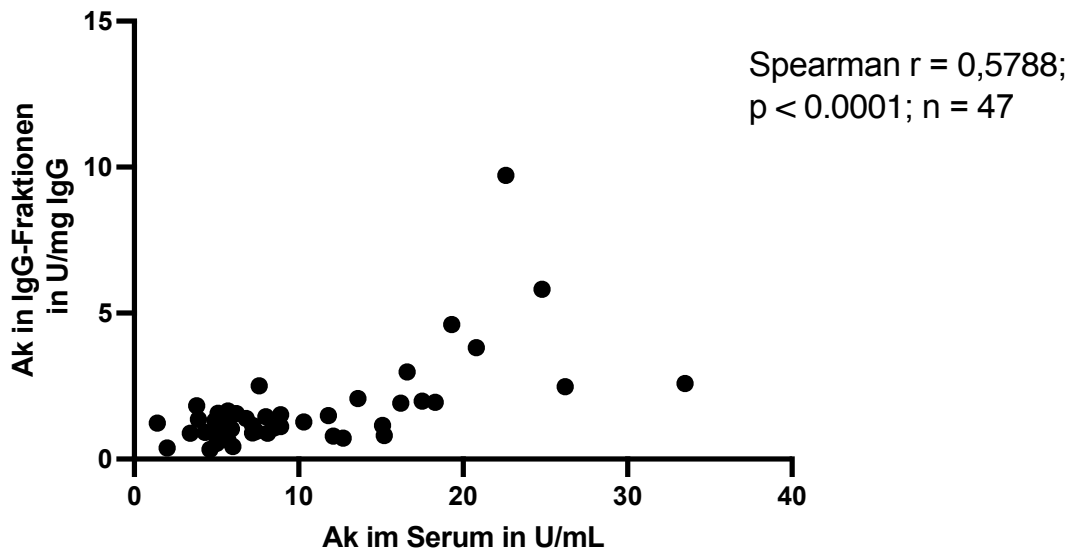


Abbildung 11. Positive Korrelation zwischen den im Serum und in den zugehörigen Immunglobulin G (IgG)-Fraktionen bestimmten Anti- $\beta_2$ -Adrenozeptor (ADR)-Autoantikörpern (Ak) bei PatientInnen mit Systemischer Sklerose (SSc), Riesenzellerarteriitis (RZA) und Rheumatoider Arthritis (RA) sowie gesunden Kontrollen. Korrelationskoeffizient nach Spearman  $r = 0,5788$ ,  $p < 0,0001$ . U/mg IgG = Units/Milligramm IgG, U/mL = Units/Milliliter.

Bei den übrigen gemessenen Anti-GPCR-Autoantikörper-Konzentrationen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen; die Daten sind im Anhang in den Abbildungen 15 und 16 aufgeführt.

Die Konzentrationen der in den Seren gemessenen Anti-AT1R-, Anti-ETAR-, Anti-PAR2-, Anti-CaSR- und Anti-CXCR4-Autoantikörpern korrelierten positiv mit den jeweiligen Autoantikörpern, die in den zugehörigen IgG-Frak-tionen gemessen worden waren; der Korrelationskoeffizient nach Spearman lag zwischen  $r = 0,4051$  und  $r = 0,7533$  jeweils mit  $p < 0,05$ . Die Daten sind im Anhang in Abbildung 17 dargestellt.

Für die Konzentrationen der Anti-CXCR3-Autoantikörpern im Serum und in den zugehörigen IgG-Frak-tionen zeigte sich hingegen keine Korrelation; der Korrelationskoeffizient nach Spearman lag bei  $r = 0,03433$  mit einem  $p$ -Wert von  $0,8188$  (Abb. 17 E im Anhang). Im Streudiagramm fielen hierbei zwei Populationen auf; eine der beiden Populationen ließ sich einer Gruppe von Autoantikörperwerten zuordnen, welche zu einem anderen Zeitpunkt mittels ELISA in den jeweiligen IgG-Frak-tionen bestimmt worden waren als die andere größere Population (Abb. 17 E im Anhang). Bei den anderen Autoantikörpern bildeten diese Werte keine eigene Population (Abb. 17 A – D und F im Anhang).

## 4.4 Veränderte Konzentrationen von Interleukin-6 im Serum von PatientInnen mit RA

In den Seren, aus denen die für die Stimulation von PBMZ genutzten IgG isoliert wurden, wurden die Konzentrationen der nachfolgenden Zytokine mittels Legendplex gemessen: Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , Tumornekrosefaktor- $\beta$ , Interleukin-2, Interleukin-4, Interleukin-6, Interleukin-12p70, Interleukin-13, Interleukin-17A und Interferon- $\gamma$ .

Der Kruskal-Wallis-Test ergab, dass sich die Mediane der Interleukin-2-Konzentrationen im Serum der vier Gruppen signifikant voneinander unterscheiden; im Post-hoc-Test erreichte nachfolgend aber keine Unterscheidung zwischen zwei der vier Gruppen das Signifikanzniveau von 0,05 (Abb. 12). Drei Messwerte der gesunden Kontrollen, drei Werte in der Gruppe der RZA und ein Wert in der Gruppe der RA lagen unterhalb der unteren Nachweisgrenze von 10,66 pg/mL. Da ein nicht-parametrischer Test genutzt wurde, konnte für diese Werte 10,66 pg/mL als Absolutwert in die Berechnungen miteinfließen.

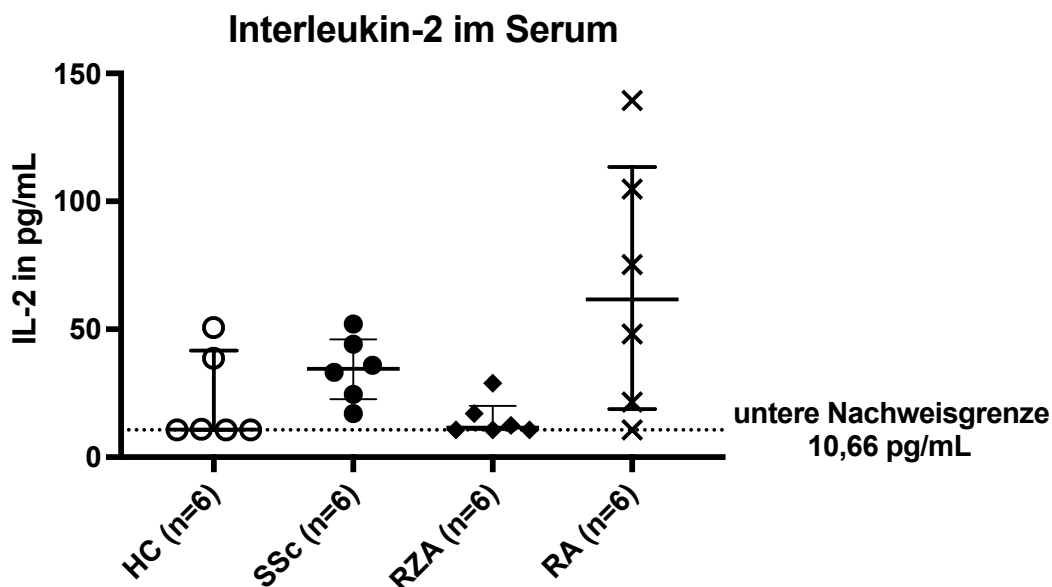


Abbildung 12. Keine Unterschiede der Konzentrationen von Interleukin-2 (IL-2) im Serum von gesunden Kontrollen (HC), PatientInnen mit Systemischer Sklerose (SSc), Riesenzellerteriitis (RZA) und Rheumatoider Arthritis (RA). Die gestrichelte Linie zeigt die untere Nachweisgrenze von 10,66 pg/mL. Dargestellt sind der Median und der Interquartilsabstand. pg/mL = Piko-gramm/Milliliter.

Die Konzentrationen von Interleukin-6 waren in der Gruppe der RA-PatientInnen im Vergleich zur Gruppe der gesunden Kontrollen signifikant erhöht (Abb. 13). Alle Messwerte lagen oberhalb der unteren Nachweisgrenze.

Für die übrigen gemessenen Zytokine zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen der PatientInnen bzw. der Gruppe der gesunden Kontrollen; die Daten sind im Anhang in Abbildung 18 dargestellt. Einige Messwerte wurden aufgrund großer Abweichungen zwischen den Doppelwerten (Variationskoeffizient > 30 %) bzw. niedriger erfasster *events per bead ID* am Durchflusszytometer (*counts* < 50) den Empfehlungen des Herstellers folgend in der Auswertung nicht berücksichtigt; dies ist der Grund, warum die n-Zahl in einigen Fällen von n = 6 abweicht.

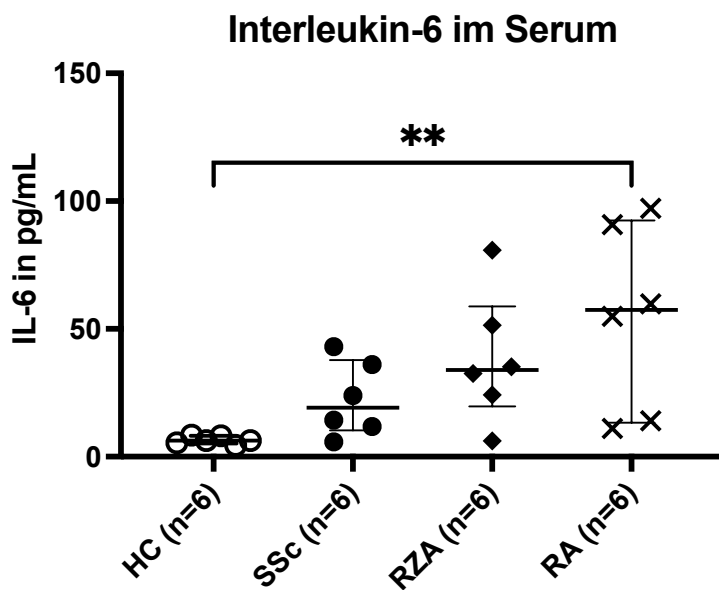
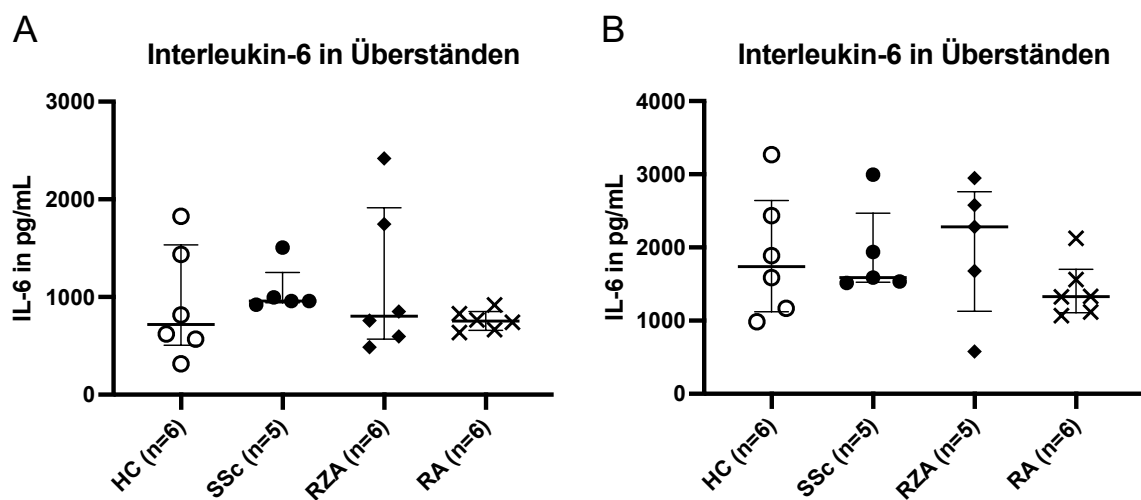


Abbildung 13. Erhöhte Konzentrationen von Interleukin-6 (IL-6) im Serum von PatientInnen mit Rheumatoider Arthritis (RA) im Vergleich zur Gruppe der gesunden Kontrollen (HC). Gezeigt werden der Median und der Interquartilsabstand. SSc = Systemische Sklerose, RZA = Riesenzellarteriitis. \*\*p<0,01. pg/mL = Pikogramm/Milliliter.

#### 4.5 Keine Unterschiede der Zytokinkonzentrationen gemessen in den Überständen nach Stimulation von PBMZ mit IgG

Nach Festlegung der Stimulationsbedingungen (Etablierung unter 4.2 dargestellt) wurden PBMZ von drei gesunden Spendern jeweils einzeln mit je sechs IgG von PatientInnen mit SSc, RZA und RA sowie mit sechs IgG gesunder Kontrollpersonen stimuliert. Die Konzentration von IgG zur Stimulierung der PBMZ lag bei 1 mg/mL. Diese IgG-Konzentration war zuvor in verschiedenen Arbeiten zur Zellstimulation genutzt worden (Günther et al., 2014; Murthy et al., 2021). Nach 24 Stunden wurden die Überstände der PBMZ abgenommen.

Anschließend wurden in diesen Überständen die unter 4.4 genannten Zytokine mittels Legendplex bestimmt. Es stellten sich zwischen den einzelnen Erkrankungsgruppen und auch im Vergleich mit der Gruppe der gesunden Kontrollen keine Unterschiede der Zytokinkonzentrationen dar. In Abbildung 14 sind die Konzentrationen von Interleukin-6 in den Überständen einzeln für die drei Stimulationsversuche exemplarisch dargestellt. Im dritten Stimulationsversuch (Abb. 14 C) lag ein Messwert aus der Gruppe der RZA oberhalb der oberen Nachweisgrenze von 12947,48 pg/mL. Dieser ist als Absolutwert in die statistische Auswertung miteinbezogen worden. Die Konzentrationen der übrigen Zytokine sind im Anhang (Abb. 19 - 21) für die drei Stimulationsversuche mit den jeweils unterschiedlichen PBMZ-Spendern aufgeführt. Es wurden wiederum einzelne Messwerte aufgrund großer Abweichungen zwischen den Doppelwerten (Variationskoeffizient > 30 %) bzw. niedriger erfasster *events per bead ID* am Durchflusszytometer (*counts* < 50) von der Auswertung ausgeschlossen, sodass die n-Zahl in einigen Fällen von n = 6 abweicht. Für alle gemessenen Zytokine zeigten sich Konzentrationen oberhalb der unteren Nachweisgrenze in der Positivkontrolle mit PMA plus Ionomycin.



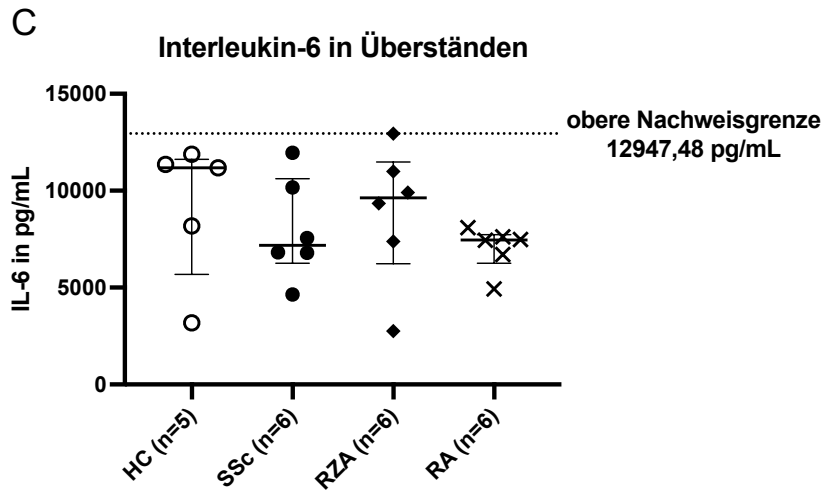


Abbildung 14. Keine Unterschiede der Interleukin-6 (IL-6)-Konzentration in den Überständen nach Stimulation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes drei verschiedener Spender (A-C) mit Immunglobulin G (IgG) von PatientInnen mit Systemischer Sklerose (SSc), Riesenzellarteriitis (RZA) und Rheumatoider Arthritis (RA) bzw. mit IgG von gesunden Kontrollen (HC). Die gestrichelte Linie in C zeigt die obere Nachweisgrenze von 12947,48 pg/mL. Gezeigt werden der Median und der Interquartilsabstand. pg/mL = Pikogramm/Milliliter.

## 5. Diskussion

### 5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst Seren und IgG-Eluate von PatientInnen mit SSc, RZA und RA und einer gesunden Kontrollgruppe auf das Vorliegen ausgewählter Anti-GPCR-Autoantikörper hin untersucht. Im Serum wurden zusätzlich die Konzentrationen verschiedener, überwiegend proinflammatorischer Zytokine bestimmt. Anschließend wurde der Einfluss der IgG-Eluate der verschiedenen PatientInnen auf die Ausschüttung eben dieser Zytokine aus PBMZ gesunder SpenderInnen *in vitro* untersucht.

Es konnte mit der SDS-PAGE als Qualitätskontrolle gezeigt werden, dass die Isolation von IgG aus humanem Serum mittels Protein G möglich ist. Sowohl in den Seren als auch in den IgG-Fraktionen von SSc-PatientInnen zeigten sich erhöhte Konzentrationen von Autoantikörpern, die gegen den  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Adrenozeptor gerichtet sind. Außerdem fanden sich veränderte Zytokinkonzentrationen im Serum von RA-PatientInnen. Nach Stimulation von PBMZ gesunder Spender mit den zuvor isolierten IgG-Eluaten, in denen sich auch Anti-GPCR-Autoantikörper befanden, konnten jedoch keine Unterschiede der Zytokinkonzentrationen in den Überständen festgestellt werden.

### 5.2 Diskussion der Methodik

Zur Stimulation der PBMZ wurden jeweils die gesamten IgG-Fraktionen von PatientInnen bzw. gesunden Kontrollen genutzt. Dies bildet am ehesten die *in vivo*-herrschenden Bedingungen ab. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass möglicherweise ein verändertes Muster verschiedenster Anti-GPCR-Autoantikörper eine Rolle in Autoimmunerkrankungen spielt (Cabral-Marques et al., 2018; Riemekasten et al., 2020), ist eine Stimulation mit Gesamt-IgG insofern von Vorteil, als dass auch Effekte, die eventuell erst durch das Zusammenspiel verschiedener Anti-GPCR-Autoantikörper entstehen, erfasst werden.

Gleichzeitig bringt die Nutzung von Gesamt-IgG anstelle von einzelnen aufgereinigten Anti-GPCR-Autoantikörpern Limitationen mit sich, die bereits von Cabral-Marques und Riemekasten, aber auch von Günther *et al.* diskutiert wurden (Cabral-Marques & Riemekasten, 2017b; Günther et al., 2014): So können bei der Nutzung von Gesamt-IgG mögliche Beobachtungen bzw. Auswirkungen nur schwer auf einen bestimmten Anti-GPCR-Autoantikörper zurückgeführt werden; Hinweise auf einen möglichen kausalen Zusammenhang würden sich bei *in vitro*-Versuchen lediglich indirekt durch Korrelationen oder durch die Auf-

hebung der Effekte durch spezifische Blocker aufzeigen lassen. Letzteres ist bei Autoantikörpern, die gegen den AT1R und den ETAR gerichtet sind, mehrfach vorbeschrieben (Becker et al., 2014; Günther et al., 2014; Kill et al., 2014).

Außerdem ist bei der Nutzung von Gesamt-IgG zu beachten, dass Effekte nicht nur durch andere Anti-GPCR-Autoantikörper als die untersuchten induziert sein könnten, sondern auch durch Autoantikörper, die an andere Strukturen binden als GPCR. In der SSc ist bspw. die Rolle von Autoantikörpern, die gegen den *Platelet-derived growth factor* (PDGF)-Rezeptor gerichtet sind, aufgrund von kontroversen Studienergebnissen viel diskutiert (Berger & Steen, 2017; Dragun et al., 2009). Paolini *et al.* stellten kürzlich in einer Übersichtsarbeit dar, warum diese Autoantikörper zur Fibrose in der SSc beitragen könnten (Paolini et al., 2022). Cabral-Marques *et al.* zeigten darüber hinaus, dass Anti-GPCR-Autoantikörper nicht nur mit anderen Anti-GPCR-Autoantikörpern korrelieren, sondern auch mit verschiedenen anderen Antikörpern, die gegen Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktor-Rezeptoren und bestimmte Signalmoleküle gerichtet sind (Cabral-Marques et al., 2018); die genaue Rolle dieser Autoantikörper in chronisch-entzündlichen Systemerkrankungen ist in vielen Fällen noch unzureichend erforscht.

Ein anderer Punkt, der bei Stimulation von PBMZ mit IgG beachtet werden muss, ist, dass auch eine unspezifische Aktivierung von Immunzellen über Bindung von IgG mit ihrem Fc-Teil an Fc-Rezeptoren möglich ist (Nimmerjahn & Ravetch, 2008). Um dies zu verhindern, nutzten Murthy *et al.* zur Fc-Rezeptor-Blockade vor der Stimulierung von THP1-Zellen mit IgG von SSc-PatientInnen TruStain, einen Fc-Rezeptor Blocker, der bei Fluoreszenzfärbungen zur Anwendung kommt. Es zeigte sich jedoch kein Unterschied zwischen den in den Überständen gemessenen Interleukin-8- und *CC-chemokine ligand 18* (CCL18)-Konzentrationen jeweils mit oder ohne Zugabe von TruStain; dies würde auf eine Fc-Rezeptor-unabhängige Ausschüttung eben dieser Zytokine hindeuten (Murthy et al., 2021). In der hier vorliegenden Arbeit zeigte sich bereits nach Zugabe von TruStain zur PBMZ-Kultur ohne Zugabe weiterer Stimulantien eine Zytokinausschüttung, gemessen durch Konzentrationsbestimmung in den Überständen. Wie oben beschrieben kam TruStain aus diesem Grund bei der Stimulation von PBMZ mit IgG von PatientInnen und gesunden Kontrollen im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht zum Einsatz.

Eine andere Variante, unspezifische Bindungen zu verhindern, die u.a. von Günther *et al.* im Stimulationsversuch mit PBMZ genutzt wurde, ist die Zugabe von IVIG zur Zellkultur

(Günther et al., 2014), spricht von humanem IgG, die im klinischen Alltag zur venösen Substitution genutzt werden. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass auch im Serum gesunder Kontrollen Anti-GPCR-Autoantikörper enthalten sind (Cabral-Marques et al., 2018). Dies war auch in der vorliegenden Arbeit zu beobachten. Vor diesem Hintergrund käme es beim Einsatz von IVIG zur Vermischung der Anti-GPCR-Autoantikörpermuster der PatientInnen und dem gesunder SpenderInnen. Der Einfluss dieser Vermischung auf die Zytokinausschüttung aus PBMZ müsste in weiteren Versuchen mittels direkter Vergleiche untersucht werden.

Eine weitere mögliche Alternative, um die Aktivierung über Fc-Rezeptoren zu verhindern, wäre die Stimulation einzig mit dem Fab- oder dem (Fab')<sub>2</sub>-Fragment der IgG. Um (Fab')<sub>2</sub>-Fragmente zu erhalten, können die IgG enzymatisch mittels Pepsin oder auch dem sog. *Immunoglobulin-degrading enzyme*, das von *Streptococcus pyogenes* produziert wird, mittlerweile aber auch kommerziell erhältlich ist, gespalten werden; dabei wird ein Großteil der Fc-Region abgetrennt, die beiden Fab-Fragmente bleiben aber über Disulfidbrücken miteinander verbunden (Falkenburg et al., 2017; Rosenstein et al., 2020).

Dass es von großer Relevanz zu sein scheint, mit welchem Teil der IgG Zellen stimuliert werden, führten Wallukat und Schimke in einem Review auf: So hatten einzelne Fab-Fragmente von Anti-β1-Adrenozeptor-Autoantikörpern *in vitro* keine agonistische Wirkung auf Kardiomyozyten, (Fab')<sub>2</sub>-Fragmente hingegen entfalteten einen agonistischen Effekt; dies deutet darauf hin, dass in diesem Fall *Cross-linking* bzw. Rezeptor-Dimerisierungen für eine agonistische Wirkung der Autoantikörper essentiell sind (Wallukat & Schimke, 2014). Da in der vorliegenden Arbeit aber keine Kardiomyozyten, sondern Immunzellen stimuliert wurden, müssten weitere Untersuchungen folgen, die die Interaktion zwischen Immunzellen und Anti-GPCR-Autoantikörpern bzw. deren Fragmenten auf molekularer Ebene genauer untersuchen.

Nach Aufreinigung der IgG-Fractionen aus humanem Serum und Umpufferung in DPBS waren in einigen der IgG-Eluate Präzipitate sichtbar. Mittels einer SDS-PAGE konnte gezeigt werden, dass sich in den Aggregaten Proteine der gleichen Molekülmasse wie auch in den Überständen befanden, es sich folglich um IgG handeln könnte. Auch bei der Herstellung von rekombinanten Proteinen zur Nutzung als Biologika stellt die Proteinaggregation ein Problem dar (Pham & Meng, 2020). Grund für das Auftreten von Aggregaten könnte die Elution der IgG mit einem niedrigem pH, hier von 2,7, während der Protein G-Affinitätschromatographie sein, welche auch von Lopez *et al.* bei der Isolation von IgG aus humanem

Plasma mittels Protein G als Ursache für ein erhöhtes Vorliegen von Aggregaten vermutet wurde (Lopez et al., 2019).

Denkbar wäre auch, dass den sichtbaren Aggregaten zumindest teilweise ein biologisches Phänomen zugrunde lag. Rheumafaktoren sind Antikörper, die gegen die Fc-Region von IgG gerichtet sind. Auch wenn Rheumafaktoren v.a. der IgM-Klasse zuzuordnen sind, gibt es auch IgG-Rheumafaktoren, die in Lösung durch Selbstassoziation Komplexe bilden können (Mannik & Nardella, 1985). Rheumafaktoren sind insbesondere im Serum von RA-PatientInnen nachweisbar, in etwa 5 % der Fälle treten sie aber auch im Serum gesunder Personen auf (Vallbracht et al., 2004). Erhöhte Werte des IgG-Rheumafaktors sind auch für die SSc beschrieben (Mimura et al., 2004). Die Tatsache, dass in den IgG-Eluaten von PatientInnen der drei Erkrankungsgruppen verglichen mit der Gruppe der gesunden Kontrollen vermehrt Präzipitate sichtbar waren, könnte für einen Beitrag spezifischer Antikörper an der Aggregation sprechen. Da aber weder für die SSc- und RZA-PatientInnen noch für die gesunden Kontrollen Rheumafaktoren bestimmt wurden, sind diese Aussagen rein spekulativ. Auch über die Zusammensetzung der Aggregate kann keine genauere Aussage getroffen werden als die, die die SDS-PAGE erlaubt.

Um eine Beeinflussung der Zytokinausschüttung aus PBMZ durch Aggregate zu verhindern, wurden alle IgG-Eluate vor Zugabe zur Zellkultur zentrifugiert. Eine Aussage darüber, ob und wenn ja, welche Antikörper dadurch womöglich verloren gingen, kann nicht getroffen werden.

Für Nachfolgearbeiten wäre die Wahl eines IgG-Isolationsverfahren, welches ohne eine Elution mittels niedrigem pH abläuft, zu evaluieren, um so einen möglichen Auslöser der Proteinaggregation auszuschalten. Ein solches Verfahren wäre bspw. die Aufreinigung mittels des sog. Melon Gel, welches im Unterschied zum Protein G nicht IgG, sondern die anderen Serumproteine bindet, sodass die IgG im Durchfluss zurückbleiben; in einer Publikation zeigten sich nach Anwendung dieses Verfahrens weniger Aggregate verglichen mit der Aufreinigung mittels einer Protein G-Affinitätschromatographie (Lopez et al., 2019).

Ein anderer zu diskutierender Punkt ist die Nutzung von PBMZ im Stimulationsversuch als primäre Zellkultur (Schaeffer, 1990). Interindividuell können Unterschiede zwischen den PBMZ-Populationen auftreten, die zu einer eingeschränkten Vergleichbarkeit der Ergebnisse der einzelnen Stimulationsversuche führen können, wie auch hier zwischen den drei unabhängigen Stimulationsversuchen beobachtet. Eine höhere Vergleichbarkeit kann bspw. durch das Nutzen einer Zelllinie erreicht werden, wie im Falle von Murthy *et al.* mit der

Nutzung von THP1-Zellen, einer monozytären Zelllinie (Murthy et al., 2021). Damit wäre darüber hinaus das Problem der geringen Verfügbarkeit von primären Zellen gelöst und eine Durchführung der Versuche mit einer höheren n-Zahl möglich. Schildberger *et al.* wiesen aber nach, dass PBMZ, THP1-Zellen und Monozyten z.T. eine unterschiedliche Zytokinausschüttung nach Stimulation mit LPS zeigen (Schildberger et al., 2013). Rückschlüsse auf *in vivo*-Prozesse könnten somit bei Verwendung einer Zelllinie in Analogie zur Stimulation mit LPS auch bei der Stimulation mit PatientInnen-IgG nur eingeschränkt möglich sein.

Auch die Nutzung des Legendplex zur Zytokinkonzentrationsbestimmung in den Zellkulturüberständen ist methodisch zu diskutieren. Dies erfolgt aufgrund der thematischen Überschneidungen in der Diskussion der Ergebnisse unter 5.3.5.

## **5.3 Diskussion der Ergebnisse**

### **5.3.1 Anti- $\beta_1$ - und Anti- $\beta_2$ -Adrenozeptor-Autoantikörper in SSc und anderen Erkrankungen**

Sowohl im Serum als auch in den aus den Seren aufgereinigten IgG-Fractionen der SSc-PatientInnen zeigten sich erhöhte Konzentrationen von Autoantikörpern, die gegen den  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Adrenozeptor gerichtet sind. Die Konzentrationen dieser Autoantikörper im Serum und den zugehörigen IgG-Fractionen aller vier Gruppen korrelierten dabei positiv miteinander. Dies ist zum derzeitigen Zeitpunkt nicht vorbeschrieben. Zur Validierung dieses Ergebnisses sollten sich Arbeiten anschließen, in denen die Konzentrationen von Anti- $\beta_1$ - und Anti- $\beta_2$ -Adrenozeptor-Autoantikörpern in einer größeren SSc-Kohorte bestimmt werden, in der, anders als hier, auch PatientInnen miteinbezogen werden, die bspw. eine geringere Krankheitsaktivität oder einen limitiert-kutanen Verlauf zeigen.

Das Auftreten von Anti- $\beta_1$ - und Anti- $\beta_2$ -Adrenozeptor-Autoantikörpern in verschiedenen anderen Erkrankungen hingegen ist vorbeschrieben: Anti- $\beta_1$ -Adrenozeptor-Autoantikörper lassen sich bei PatientInnen mit verschiedenen kardialen Erkrankungen nachweisen, wie etwa einigen Kardiomyopathie-Formen, aber auch Arrhythmien (Wallukat & Schimke, 2014). Seit 1980 ist mehrfach das Vorkommen von Anti- $\beta_2$ -Adrenozeptor-Autoantikörpern im Serum von PatientInnen mit Asthma bronchiale beschrieben, die klinische Relevanz dieser Autoantikörper ist aber bis heute nicht geklärt (Mukherjee & Nair, 2018). 2016 fanden Loebel *et al.* erhöhte Werte von Autoantikörpern, die gegen den  $\beta_2$ -Adrenozeptor gerichtet sind, im Serum von PatientInnen, die an einem Chronischen Erschöpfungssyndrom leiden, im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (Loebel et al., 2016).

Vor diesem Hintergrund wäre anhand einer größeren Stichprobe als der für diese Arbeit vorliegenden eine Untersuchung der Konzentration von Anti- $\beta_1$ -Adrenozeptor-Autoantikörpern von SSc-PatientInnen im Hinblick auf einen möglichen Zusammenhang mit einer kardialen Beteiligung interessant; besonders hervor zu heben wären hierbei Arrhythmien, die, wie oben beschrieben, bereits mit Anti- $\beta_1$ -Adrenozeptoren in Verbindung gebracht wurden und auch in der SSc von Bedeutung sind: In einer großen SSc-Kohorte waren Arrhythmien für 6 % aller Todesfälle verantwortlich (Tyndall et al., 2010). Außerdem wäre ein möglicher Zusammenhang zwischen Anti- $\beta_2$ -Adrenozeptor-Autoantikörpern und einer pulmonalen Beteiligung zu untersuchen. Da bei SSc-PatientInnen im Vergleich zur Normalbevölkerung gehäuft eine Fatigue-Symptomatik auftritt (Basta et al., 2018), wäre auch hier ein Blick auf eine mögliche Korrelation mit Anti- $\beta_2$ -Adrenozeptor-Autoantikörpern von Interesse. Es sollte somit in Folgearbeiten nicht nur untersucht werden, ob die Anti- $\beta_1$ - und Anti- $\beta_2$ -Adrenozeptor-Autoantikörper von diagnostischer Bedeutung, sondern womöglich auch von pathophysiologischer Relevanz in der SSc sind.

### **5.3.2 Anti-GPCR-Autoantikörper in RZA und RA**

Über das Vorkommen von Anti-GPCR-Autoantikörpern und deren Rolle in der RZA ist wenig bekannt. 2019 fanden sich erstmals erniedrigte Anti-ETAR-Autoantikörper im Serum von RZA-PatientInnen im Vergleich zu gesunden Kontrollen; außerdem zeigte sich ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von ischämischen Komplikationen bei RZA-PatientInnen mit besonders niedrigen Anti-ETAR-Autoantikörper-Werten (Klapa et al., 2019). Diese Erniedrigung konnte hier nicht reproduziert werden, was möglicherweise auf die kleine Stichprobengröße zurückzuführen ist. Auffällig waren aber sowohl in den hier erhobenen Daten als auch bei Klapa *et al.* Ausreißer mit hohen Antikörperkonzentrationen unter den RZA-PatientInnen. Korrelationen zwischen den Anti-ETAR-Autoantikörpern und individuellen Parametern wie dem CRP-Wert oder der Blutsenkungsgeschwindigkeit konnten in der Studienkohorte aber nicht gezeigt werden (Klapa et al., 2019). Größere Studien, die möglicherweise auch Autoantikörperwerte von RZA-PatientInnen im Verlauf darstellen, bleiben abzuwarten.

In der RA ist das Vorkommen verschiedener Autoantikörper, u.a. von Rheumafaktoren und Antikörpern gegen das citrullinierte Peptid, beschrieben; diese sind insbesondere von diagnostischer Relevanz, auch wenn mittlerweile angenommen wird, dass sie eine pathophysiologische Rolle spielen (Derksen et al., 2017; Firestein & McInnes, 2017; Weyand & Goronzy, 2021). Bezüglich der Rolle von Anti-GPCR-Autoantikörpern in der RA liegen erst

wenige Daten vor: Kürzlich zeigten sich verminderte Konzentrationen von Autoantikörpern, die gegen den C3a- und den C5a-Rezeptor sowie gegen den CXCR3 und den CXCR4 gerichtet sind, im Serum von RA-PatientInnen im Vergleich zum Serum gesunder Kontrollen; für Autoantikörper, die gegen den ETAR und den  $\beta_2$ -Adrenozeptor gerichtet sind, zeigten sich hingegen keine Unterschiede (Yue et al., 2021). Zuvor war bereits ein verändertes Muster von Anti-GPCR-Autoantikörpern bei RA-PatientInnen beschrieben worden (Cabral-Marques et al., 2018). Experimente zur funktionellen Aktivität und Studien zur klinischen Relevanz dieser potenziell veränderten Autoantikörper bleiben abzuwarten. In der vorliegenden Arbeit zeigten sich für den CXCR3 und den CXCR4 keine Unterschiede im Serum von RA-PatientInnen verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe, was wiederum womöglich auf die kleine Stichprobengröße zurückzuführen ist.

### **5.3.3 Korrelationen zwischen Anti-GPCR-Autoantikörpern im Serum und in zugehörigen IgG-Fractionen**

Auffällig war, dass die Konzentrationen aller gemessenen Anti-GPCR-Autoantikörper im Serum und in den zugehörigen IgG-Fractionen positiv miteinander korrelierten mit Ausnahme der Anti-CXCR3-Autoantikörper. Ein Teil der Autoantikörperkonzentrationen in den IgG-Fractionen ist zu einem späteren Zeitpunkt mittels der gleichen Methode (ELISA) bestimmt worden als die Autoantikörperkonzentrationen in den Seren und den übrigen IgG-Fractionen. Wurden die Daten im Streudiagramm der Anti-CXCR3-Autoantikörperwerte im Serum und in IgG-Fractionen nach diesem Merkmal unterschieden, kamen zwei Populationen zur Darstellung. Die fehlende Korrelation bei den Anti-CXCR3-Autoantikörpern ist somit womöglich auf die Durchführung der Konzentrationsmessungen an verschiedenen Zeitpunkten zurückzuführen. Bei den übrigen Autoantikörpern waren bei Unterscheidung nach dem Messzeitpunkt keine eindeutigen unterschiedlichen Populationen auszumachen. Bei Nachfolgearbeiten, in denen ebenfalls verschiedene Anti-GPCR-Autoantikörper bestimmt werden, wären somit Untersuchungen die Stabilität der Konzentrationsmessungen betreffend mit besonderem Blick auf die Anti-CXCR3-Autoantikörper zu erwägen.

### **5.3.4 Zytokinkonzentrationen im Serum von PatientInnen mit chronisch-entzündlichen Autoimmunerkrankungen**

In der vorliegenden Arbeit fanden sich erhöhte Interleukin-6-Konzentrationen im Serum von RA-PatientInnen verglichen mit gesunden Kontrollen. Für die übrigen Zytokine zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Erkrankungsgruppen bzw. der Gruppe der gesunden Kontrollen.

### 5.3.4.1 Interleukin-2

Interleukin-2 ist ein Zytokin, dem lange eine proinflammatorische Wirkung durch die Aktivierung von T-Zellen zugesprochen wurde; neuere Erkenntnisse zeigten aber, dass Interleukin-2 darüber hinaus eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz spielt (Klatzmann & Abbas, 2015). Dies geschieht insbesondere durch die Interleukin-2-abhängige Produktion und Erhaltung von regulatorischen T-Zellen, den sogenannten  $T_{reg}$ -Zellen (Chinen et al., 2016; Malek & Bayer, 2004). Vor diesem Hintergrund wurden Studien durchgeführt, in denen PatientInnen mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen niedrig dosiertes Interleukin-2 erhielten; es zeigten sich bereits erste positive Ergebnisse (Graßhoff et al., 2021). Bereits 2013 wurde ein/eine PatientIn mit einer Erkrankung aus dem rheumatischen Formenkreis, dem Systemischen Lupus erythematoses, mit niedrig dosiertem Interleukin-2 behandelt (Humrich et al., 2015). In einer anderen Studie mit niedrig dosiertem Interleukin-2 wurden auch RA-PatientInnen miteingeschlossen (Rosenzwajg et al., 2019). Auch in der SSc gibt es Hinweise darauf, dass die  $T_{reg}$ -Population verändert ist; ob dies eine pathophysiologische Rolle spielt, ist noch nicht abschließend geklärt (Frantz et al., 2018). Es wurden bereits SSc-PatientInnen im Rahmen einer Studie (TRANSREG-Studie, NCT01988506) mit niedrig dosiertem Interleukin-2 behandelt, die Ergebnisse sind derzeit noch nicht veröffentlicht. Für die RZA ist ein signifikant erniedrigter Anteil von  $T_{reg}$ -Zellen an allen  $CD4^+$ -T-Zellen bei neu diagnostizierten RZA-PatientInnen im Vergleich zur Gruppe der gesunden Kontrollen beschrieben (Samson et al., 2021). Ob die Gabe von niedrig dosiertem Interleukin-2 auch bei RZA-PatientInnen sinnvoll wäre, ist bisher nicht ausreichend untersucht. Insgesamt müssen größere Studien abgewartet werden, um eine Aussage über die klinische Wirksamkeit der Therapie mit niedrig dosiertem Interleukin-2 bei rheumatischen Erkrankungen treffen zu können.

Erhöhte Konzentrationen von Interleukin-2 im Serum von RA-PatientInnen, insbesondere bei PatientInnen in einer aktiven Krankheitsphase, im Vergleich zu gesunden Kontrollen ist beschrieben (W. Wang et al., 2012). In einer anderen Arbeit fand sich eine positive Korrelation zwischen der Interleukin-2-Konzentration und der Krankheitsaktivität bei RA-PatientInnen (B. Li et al., 2020). Auch für die SSc sind erhöhte Serumwerte im Vergleich zu Seren von gesunden Kontrollen beschrieben (Famularo et al., 1990). Ein fehlender signifikanter Unterschied zwischen den Interleukin-2-Konzentrationen bei der RA und SSc verglichen mit gesunden Kontrollen in den hier vorliegenden Daten ist möglicherweise auf die geringe n-Zahl von je sechs und die große Streuung der Interleukin-2-Konzentrationen bei den RA-PatientInnen zurückzuführen.

Es zeigten sich in den hier vorliegenden Daten keine Unterschiede zwischen den Interleukin-2-Konzentrationen in den Seren von RZA-PatientInnen und den Seren gesunder Kontrollen. Dies ist so vorbeschrieben (van der Geest et al., 2015).

#### **5.3.4.2 Interleukin-4**

In einer Arbeit, in der Zytokinkonzentrationen ebenfalls mittels einer Bead-basierten, durchflusszytometrischen Messung im Serum von RA-PatientInnen erhoben wurden, zeigten sich erhöhte Interleukin-4-Werte unabhängig von der Krankheitsaktivität im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (W. Wang et al., 2012); dies konnte so nicht reproduziert werden, was möglicherweise ebenfalls auf die geringe n-Zahl zurückzuführen ist. Interleukin-4 ist ein Zytokin, dem sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben werden; seine genaue Rolle in der rheumatoiden Arthritis ist nach wie vor unklar (Dong et al., 2018).

In einer Studie, bei der verschiedene Serummarker auf ihren Zusammenhang mit der Krankheitsaktivität in der RZA und der Polymyalgia rheumatica untersucht wurden, zeigten sich für Interleukin-4 hingegen keine Unterschiede im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (van der Geest et al., 2015).

Für die SSc finden sich in der Literatur z.T. widersprüchliche Daten bezüglich der Interleukin-4-Konzentration im Serum: Famularo *et al.* fanden im Serum von SSc-PatientInnen im Vergleich zu gesunden Kontrollen keine erhöhten Interleukin-4-Level; es zeigten sich aber erhöhte Werte von Interleukin-4 in den Überständen von zuvor mit Phytohämoagglutinin stimulierten PBMZ von SSc-PatientInnen im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Famularo et al., 1990). Needleman *et al.* beschrieben hingegen erhöhte Interleukin-4-Serumwerte bei SSc-PatientInnen bzw. fanden sich bei den SSc-PatientInnen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe vermehrt messbare Konzentrationen (Needleman et al., 1992). Es wird angenommen, dass Interleukin-4 als profibrotisches Zytokin eine Rolle in der Pathophysiologie der SSc spielen könnte (Huang et al., 2015; Shima, 2021). Kürzlich konnten Allanore *et al.* eine signifikante Reduktion des *modified Rodnan skin score*, einem Maß zur Erfassung der Hautverdickung, bei PatientInnen mit dSSc nach Gabe von Romilkimab im Vergleich zu Placebo nachweisen. Romilkimab ist ein Antikörper, der sowohl gegen Interleukin-4 als auch Interleukin-13, ein anderes profibrotisches Zytokin, gerichtet ist und diese neutralisiert (Allanore et al., 2020).

#### **5.3.4.3 Interleukin-6**

Bei der Messung von Interleukin-6 fanden sich erhöhte Konzentrationen im Serum von RA-PatientInnen im Vergleich zur Gruppe der gesunden Kontrollen. Das Zytokin Interleukin-6

hat Einfluss auf viele Vorgänge im menschlichen Körper, u.a. spielt es als proinflammatorisches Zytokin eine wichtige Rolle in der Immunabwehr und dem Entzündungsgeschehen (Kang et al., 2020; Rose-John, 2020). Ein Einfluss von Interleukin-6 auf Autoimmunerkrankungen wird seit Langem angenommen (Ishihara & Hirano, 2002). Die Anti-Interleukin-6-Therapie mittels des Interleukin-6-Rezeptor-Blockers Tocilizumab ist mittlerweile für die RA und auch für die RZA etabliert und zugelassen (Kang et al., 2019; Stone et al., 2017). Nachdem erste Studien, in denen SSc-PatientInnen mit Tocilizumab behandelt wurden, den primären Endpunkt verpasst hatten, sind weitere Studien abzuwarten, um möglicherweise eine Wirksamkeit in bestimmten SSc-PatientInnengruppen aufzudecken (Kang et al., 2019). Erhöhte Interleukin-6-Werte im Serum von SSc-PatientInnen (Codullo et al., 2011; Khan et al., 2012), RZA-PatientInnen (García-Martínez et al., 2010; Samson et al., 2021; van der Geest et al., 2015) und RA-PatientInnen (W. Wang et al., 2012) sind vorbeschrieben. Dies konnte somit in der vorliegenden Arbeit für die RA reproduziert werden. Für die SSc und die RZA zeigten sich keine signifikanten Unterschiede verglichen mit der Gruppe der gesunden Kontrollen.

### **5.3.5 Einfluss von Anti-GPCR-Autoantikörpern auf die Zytokinausschüttung aus Immunzellen**

In dieser Arbeit konnte kein Einfluss der IgG-Fraktionen von PatientInnen im Vergleich zu IgG-Fraktionen gesunder Kontrollen auf die Ausschüttung bestimmter Zytokine aus PBMZ *in vitro* nachgewiesen werden.

Günther *et al.* konnten 2014 zeigen, dass in den Überständen von PBMZ, die mit IgG von SSc-PatientInnen stimuliert worden waren, höhere Konzentrationen von Interleukin-8 und CCL-18 nachweisbar waren als in den Überständen von PBMZ, die mit IgG gesunder Kontrollen stimuliert worden waren; allerdings war lediglich Interleukin-8 signifikant erhöht. Wurden die PBMZ zuvor mit Valsartan, einem spezifischen AT1R-Blocker, oder Sitaxsentan, einem ETAR-Blocker, inkubiert, war die Konzentration von Interleukin-8 und CCL-18 in den Überständen nach Stimulation mit SSc-IgG geringer. Die Zytokinkonzentrationen waren anders als in dieser Arbeit mittels eines ELISA bestimmt worden (Günther et al., 2014). Da in der hier vorliegenden Arbeit weder Interleukin-8 noch CCL-18 bestimmt wurden, lässt sich keine Aussage darüber treffen, ob dieses Ergebnis hätten reproduziert werden können.

Kürzlich konnte dies an einer monozytären Zelllinie (THP1-Zellen) bestätigt werden: Es zeigten sich sowohl für Interleukin-8 als auch für CCL-18 signifikant erhöhte Konzentrationen.

onen im Überstand nach Stimulation der THP1-Zellen mit SSc-IgG im Vergleich zur Stimulation mit IgG von gesunden Kontrollen; Interleukin-8 und CCL-18 waren hier ebenfalls mittels ELISA bestimmt worden (Murthy et al., 2021).

Darüber hinaus führten Murthy *et al.* eine semiquantitative Bestimmung verschiedenster Zytokine in den Überständen der THP1-Zellen mittels eines Protein-Microarrays durch, nachdem die Zellen entweder mit IgG eines SSc-Patienten/einer SSc-Patientin oder mit IgG gesunder Kontrollen stimuliert worden waren. Dabei fanden sich Veränderungen zwischen den SSc-IgG und den IgG gesunder Kontrollen, aber auch unter den SSc-PatientInnen zeigten sich große Unterschiede. Insgesamt stellte sich das Sekretom der THP1-Zellen bei Stimulation mit SSc-IgG proinflammatorisch und profibrotisch verändert dar (Murthy et al., 2021). Dass die Wahl der Methode zur Messung der Zytokinkonzentrationen von Bedeutung zu sein scheint, zeigten auch Djoba Siawaya *et al.*: So konnte für verschiedene Luminex-Kits, bei welchen es sich, ähnlich dem Legendplex, ebenfalls um Bead-basierte Immunassays zur Zytokinbestimmung handelt, gezeigt werden, dass verglichen mit einem ELISA nicht alle untersuchten Kits gleich gut zur Konzentrationsbestimmung geeignet waren (Djoba Siawaya et al., 2008). Dies sollte in Folgearbeiten beachtet werden. Es wäre bspw. ein direkter Vergleich von Zytokinmessungen in Seren und Überständen mittels Legendplex und mittels ELISA zur Validierung möglich. Auch eine Zytokinbestimmung mittels eines Protein-Microarrays, wie in oben erwähnter Arbeit (Murthy et al., 2021), wäre als Alternative denkbar. Aufgrund der Möglichkeit, viele verschiedene Zytokine zeitgleich in einer einzelnen Probe messen zu können, sowie der bereits publizierten positiven Resultate erscheinen Protein-Microarrays derzeit womöglich als Methode der Wahl.

Interessanterweise ließen sich die Effekte der SSc-IgG bei Murthy *et al.* weder durch Valsartan noch durch Sitaxsentan aufheben (Murthy et al., 2021). Wie auch von Murthy *et al.* diskutiert, zeigt dieser Fakt, dass in vielen Fällen noch unklar ist, auf welche Autoantikörper und entsprechenden Rezeptoren bestimmte Effekte zurückzuführen sind. Zu beachten ist auch die Annahme, dass viele Anti-GPCR-Autoantikörper nicht nur eine agonistische oder auch antagonistische Wirkung entfalten können, sondern auch als allosterische Modulatoren wirken; allosterisch bedeutet, dass sie an anderer Stelle am jeweiligen Rezeptor binden als der natürliche Ligand (Skiba & Kruse, 2021). Die Ligandenbindungsstellen liegen häufig im Bereich von hydrophoben Taschen, Anti-GPCR-Autoantikörper binden hingegen an Epitope im Bereich der extrazellulären Schleifen (Wallukat & Schimke, 2014). Die Wirkung eines Autoantikörpers kann somit in Beisein eines natürlichen Agonisten anders sein als die des

Autoantikörpers alleine, der Autoantikörper kann aber auch die Wirkung des Agonisten beeinflussen (Skiba & Kruse, 2021). Becker *et al.* konnten bereits zeigen, dass SSc-IgG, in denen zuvor Anti-AT1R- und Anti-ETAR-Autoantikörper nachgewiesen worden waren, die Effekte der natürlichen Liganden Angiotensin II und Endothelin-1 in pulmonalen Gefäßen von Ratten verstärken konnten (Becker et al., 2014). Dies sollte in Nachfolgearbeiten berücksichtigt werden, indem bspw. auch die Kombination aus natürlichen Liganden und PatientInnen-IgG zur Stimulation verschiedener Zelltypen genutzt wird.

Auch ein Einfluss von Autoantikörpern, die gegen den  $\beta_1$ -Adrenozeptor gerichtet sind, auf die Zytokinausschüttung aus Immunzellen ist beschrieben: Du *et al.* stimulierten T-Zellen mit IgG aus Seren von PatientInnen mit einer dilatativen Kardiomyopathie. In den Seren waren zuvor die Level von Anti- $\beta_1$ -Adrenozeptor-Autoantikörpern gemessen worden; anhand dieser Werte wurden die PatientInnen in eine Antikörper-positive und -negative Gruppe eingeteilt. Nach Stimulation der T-Zellen fanden sich in den Überständen der Anti- $\beta_1$ -Adrenozeptor-Autoantikörper-positiven Gruppe erniedrigte Werte von Interferon- $\gamma$  und erhöhte Werte von Interleukin-4 verglichen mit der Antikörper-negativen Gruppe (Du, Yan, Wang, et al., 2012). Du *et al.* konnten in einer anderen Arbeit auch erhöhte Tumornekrosefaktor- $\alpha$ -Werte nach Stimulation einer Makrophagen-Zelllinie mit Anti- $\beta_1$ -Adrenozeptor-Autoantikörper-positiven IgG im Überstand nachweisen (Du, Yan, Du, et al., 2012). Ein Effekt der im Serum bzw. in den aufgereinigten IgG-Fractionen von SSc-PatientInnen enthaltenen Anti- $\beta$ -Adrenozeptor-Autoantikörper auf die Zytokinausschüttung aus PBMZ konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden.

## 5.4 Limitationen

Eine Limitation der Arbeit ergibt sich aus den drei heterogenen Erkrankungsgruppen und der damit nicht optimal in Alter und Geschlecht entsprechenden Kontrollgruppe. Auch die drei PatientInnengruppen unterscheiden sich bezüglich Alter und Geschlecht. Sowohl die Menge von IgG-Autoantikörpern, die insgesamt im Serum zu finden ist, (Nagele et al., 2013), als auch das Anti-GPCR-Autoantikörper-Muster im Speziellen (Cabral-Marques et al., 2018) scheint aber von beiden Faktoren beeinflusst zu werden. In nachfolgenden Experimenten sollte möglichst für jede Erkrankung eine eigene entsprechende Kontrollgruppe genutzt werden, um alters- und geschlechtsabhängige Effekte zu minimieren.

Auch die Nutzung von sechs IgG-Fraktionen, die aus den Seren von an SSc erkrankten Männern isoliert wurden, in den Stimulationsversuchen im Vergleich zur Nutzung von IgG-Fraktionen beider Geschlechter in den übrigen drei Gruppen ist als Limitation zu nennen. In Folgearbeiten wäre die Wahl gleicher Geschlechterverhältnisse zu empfehlen; auch eine Trennung nach Geschlechtern zur Aufdeckung möglicher geschlechtsspezifischer Unterschiede wäre zu erwägen.

Zu erwähnen ist außerdem die Umstellung des Bindungspuffers für die IgG-Isolation mittels der Protein G-Affinitätschromatographie im Verlauf. Dadurch wurden nicht alle IgG-Fraktionen, die im weiteren Verlauf zur PBMZ-Stimulation genutzt wurden, unter den gleichen Bedingungen isoliert. Dies ist für die Vergleichbarkeit nicht optimal. Da aber der pH-Wert bei beiden verwendeten Bindungspuffern gleich war und die IgG nach Isolation unabhängig vom genutzten Bindungspuffer in DPBS umgepuffert wurden, ist die Beeinflussung der PBMZ-Stimulation durch diese Änderung eher als gering einzuschätzen.

Eine weitere Limitation der vorliegenden Arbeit ergibt sich aus der geringen n-Zahl. Bei den Messungen der Zytokine mittels Legendplex mussten zudem Werte ausgeschlossen werden, da einige Doppelwerte zu stark voneinander abwichen und/oder zu wenige *events per bead ID* vom Durchflusszytometer erfasst worden waren. Dies führte vereinzelt zu einer weiteren Reduktion der n-Zahl. Behebbarere Ursachen für diese einzelnen Abweichungen konnten im *troubleshooting* nicht ausgemacht werden. Daher ist auch die Nutzung des Legendplex, wie oben bereits erwähnt, als mögliche Limitation zu diskutieren bzw. in direkten Vergleichen mit anderen Methoden hinsichtlich seiner Sensitivität zu überprüfen.

## 6. Zusammenfassung

Trotz intensiver Forschung sind die pathophysiologischen Vorgänge in vielen Autoimmunerkrankungen nicht gänzlich verstanden. Häufig gestaltet sich die Behandlung betroffener PatientInnen schwierig. Der Nachweis eines veränderten Musters von Autoantikörpern, die gegen unterschiedliche G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) gerichtet sind, in verschiedenen Autoimmunerkrankungen lässt vermuten, dass diese Autoantikörper eine Rolle in der Krankheitsentstehung spielen könnten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Hypothese nachgegangen, dass Anti-GPCR-Autoantikörper mit Immunzellen interagieren und so das Zytokinprofil in chronisch-entzündlichen Autoimmunerkrankungen verändern. Dafür wurden in Seren und Immunglobulin G (IgG)-Fraktionen von PatientInnen, die an Systemischer Sklerose (SSc), Riesenzellarteriitis oder Rheumatoider Arthritis erkrankt sind, ausgewählte Anti-GPCR-Autoantikörper gemessen. Mit den isolierten IgG-Fraktionen wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMZ) gesunder SpenderInnen stimuliert. In den Überständen dieser Zellen und auch in den Seren der PatientInnen wurden im Anschluss verschiedene Zytokine bestimmt.

Es konnten in den Seren und auch in den zugehörigen IgG-Fraktionen der SSc-PatientInnen erhöhte Konzentrationen von Autoantikörpern, die gegen den  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Adrenozeptor gerichtet sind, nachgewiesen werden. Zudem zeigten sich veränderte Interleukin-6-Konzentrationen im Serum der PatientInnen im Vergleich zur Gruppe der gesunden Kontrollen. Nach Stimulation der PBMZ mit IgG waren in den Überständen Zytokine nachweisbar, es zeigten sich aber keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen.

Es konnte kein Effekt der in den IgG-Fraktionen enthaltenen Anti-GPCR-Autoantikörpern auf die Zytokinausschüttung aus PBMZ gesunder SpenderInnen gezeigt werden. Es fanden sich aber erstmalig erhöhte Konzentrationen von Anti- $\beta$ 1- und Anti- $\beta$ 2-Adrenozeptor-Autoantikörpern bei SSc-PatientInnen. Um dies zu validieren und eine Aussage bezüglich der womöglich diagnostischen oder pathophysiologischen Relevanz dieser erhöhten Autoantikörper treffen zu können, sollten deren Konzentrationen in einer größeren SSc-Kohorte bestimmt werden. Zur weiteren Untersuchung des Einflusses von Anti-GPCR-Autoantikörpern auf das Zytokinprofil sollten sich Experimente anschließen, die weiterhin Gesamt-IgG zur Stimulation nutzen, in denen aber bspw. andere Zellen unter veränderten Bedingungen stimuliert werden. Gleichzeitig ist für das Verständnis der *in vivo*-Wirkung von Anti-GPCR-Autoantikörpern aber auch die Untersuchung der Autoantikörper-Rezeptor-Interaktionen auf molekularer Ebene von großem Interesse, um so die Wirkung der einzelnen Autoantikörper besser zu verstehen und möglicherweise neue Therapieansätze zu schaffen.

## 7. Literaturverzeichnis

- Alamanos, Y., Voulgari, P. V., & Drosos, A. A. (2006). Incidence and Prevalence of Rheumatoid Arthritis, Based on the 1987 American College of Rheumatology Criteria: A Systematic Review. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, *36*, 182–188.
- Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A. J., Funovits, J., Felson, D. T., Bingham, C. O., Birnbaum, N. S., Burmester, G. R., Bykerk, V. P., Cohen, M. D., Combe, B., Costenbader, K. H., Dougados, M., Emery, P., Ferraccioli, G., Hazes, J. M. W., Hobbs, K., Huizinga, T. W. J., Kavanaugh, A., ... Hawker, G. (2010). 2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative. *Arthritis & Rheumatism*, *62*, 2569–2581.
- Aletaha, D., & Smolen, J. S. (2018). Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, *320*, 1360–1372.
- Allanore, Y., Wung, P., Soubrane, C., Esperet, C., Marrache, F., Bejuit, R., Lahmar, A., Khanna, D., Denton, C. P., & Investigators. (2020). A randomised, double-blind, placebo-controlled, 24-week, phase II, proof-of-concept study of romilkimab (SAR156597) in early diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *79*, 1600–1607.
- Baerwald, C. G. O., Laufenberg, M., Specht, T., Von Wichert, P., Burmester, G. R., & Krause, A. (1997). Impaired sympathetic influence on the immune response in patients with rheumatoid arthritis due to lymphocyte subset-specific modulation of  $\beta$ 2-adrenergic receptors. *British Journal of Rheumatology*, *36*, 1262–1269.
- Basta, F., Afeltra, A., & Margiotta, D. P. E. (2018). Fatigue in systemic sclerosis: a systematic review. *Clinical and Experimental Rheumatology*, *36*, 150–160.
- Becker, M. O., Kill, A., Kutsche, M., Guenther, J., Rose, A., Tabeling, C., Witzenrath, M., Kühl, A. A., Heidecke, H., Ghofrani, H. A., Tiede, H., Schermuly, R. T., Nickel, N., Hoeper, M. M., Lukitsch, I., Gollasch, M., Kuebler, W. M., Bock, S., Burmester, G. R., ... Riemekasten, G. (2014). Vascular Receptor Autoantibodies in Pulmonary Arterial Hypertension Associated with Systemic Sclerosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *190*, 808–817.
- Benfaremo, D., Svegliati Baroni, S., Manfredi, L., Moroncini, G., & Gabrielli, A. (2020). Putative functional pathogenic autoantibodies in systemic sclerosis. *European Journal of Rheumatology*, *7(Suppl3)*, S181–S186.
- Bergamasco, A., Hartmann, N., Wallace, L., & Verpillat, P. (2019). Epidemiology of systemic sclerosis and systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. *Clinical Epidemiology*, *11*, 257–273.
- Berger, M., & Steen, V. D. (2017). Role of anti-receptor autoantibodies in pathophysiology of scleroderma. *Autoimmunity Reviews*, *16*, 1029–1035.
- Bradley, J. (1974). Immunoglobulins. *Journal of Medical Genetics*, *11*, 80–90.
- Broen, J. C. A., Radstake, T. R. D. J., & Rossato, M. (2014). The role of genetics and epigenetics in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Nature Reviews Rheumatology*, *10*, 671–681.
- Brühl, H., Vielhauer, V., Weiss, M., Mack, M., Schlöndorff, D., & Segerer, S. (2005). Expression of DARC, CXCR3 and CCR5 in giant cell arteritis. *Rheumatology (Oxford)*, *44*, 309–313.
- Cabral-Marques, O., Marques, A., Giil, L. M., De Vito, R., Rademacher, J., Günther, J., Lange, T., Humrich, J. Y., Klapa, S., Schinke, S., Schimke, L. F., Marschner, G., Pitann, S., Adler, S., Dechend, R., Müller, D. N., Braicu, I., Sehoul, J., Schulze-Forster, K., ... Riemekasten, G. (2018). GPCR-specific autoantibody signatures are associated with physiological and pathological immune homeostasis. *Nature Communications*, *9*, 5224.
- Cabral-Marques, O., & Riemekasten, G. (2017a). Functional autoantibodies directed against cell

- surface receptors in systemic sclerosis. *Journal of Scleroderma and Related Disorders*, 2, 160–168.
- Cabral-Marques, O., & Riemekasten, G. (2017b). Functional autoantibodies targeting G protein-coupled receptors in rheumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, 13, 648–656.
- Chidiac, P., Hebert, T. E., Valiquette, M., Dennis, M., & Bouvier, M. (1994). Inverse agonist activity of  $\beta$ -adrenergic antagonists. *Molecular Pharmacology*, 45, 490–499.
- Chinen, T., Kannan, A. K., Levine, A. G., Fan, X., Klein, U., Zheng, Y., Gasteiger, G., Feng, Y., Fontenot, J. D., & Rudensky, A. Y. (2016). An essential role for the IL-2 receptor in T reg cell function. *Nature Immunology*, 17, 1322–1333.
- Cho, J. H., & Gregersen, P. K. (2011). Genomics and the Multifactorial Nature of Human Autoimmune Disease. *The New England Journal of Medicine*, 365, 1612–1623.
- Codullo, V., Baldwin, H. M., Singh, M. D., Fraser, A. R., Wilson, C., Gilmour, A., Hueber, A. J., Bonino, C., McInnes, I. B., Montecucco, C., & Graham, G. J. (2011). An investigation of the inflammatory cytokine and chemokine network in systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 70, 1115–1121.
- Crilly, A., Burns, E., Nickdel, M. B., Lockhart, J. C., Perry, M. E., Ferrell, P. W., Baxter, D., Dale, J., Dunning, L., Wilson, H., Nijjar, J. S., Gracie, J. A., Ferrell, W. R., & McInnes, I. B. (2012). PAR2 expression in peripheral blood monocytes of patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 71, 1049–1054.
- Crowson, C. S., Matteson, E. L., Myasoedova, E., Michet, C. J., Ernste, F. C., Warrington, K. J., Davis, J. M. 3rd, Hunder, G. G., Thorneau, T. M., & Gabriel, S. E. (2011). The lifetime risk of adult-onset rheumatoid arthritis and other inflammatory autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis & Rheumatism*, 63, 633–639.
- Davidson, A., & Diamond, B. (2001). Autoimmune Diseases. *The New England Journal of Medicine*, 345, 340–350.
- Debnath, B., Xu, S., Grande, F., Garofalo, A., & Neamati, N. (2013). Small molecule inhibitors of CXCR4. *Theranostics*, 3, 47–75.
- Dejaco, C., Brouwer, E., Mason, J. C., Buttgereit, F., Matteson, E. L., & Dasgupta, B. (2017). Giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica: Current challenges and opportunities. *Nature Reviews Rheumatology*, 13, 578–592.
- Denton, C. P., & Khanna, D. (2017). Systemic sclerosis. *The Lancet*, 390, 1685–1699.
- Derksen, V. F. A. M., Huizinga, T. W. J., & van der Woude, D. (2017). The role of autoantibodies in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Seminars in Immunopathology*, 39, 437–446.
- Djoba Siawaya, J. F., Roberts, T., Babb, C., Black, G., Golakai, H. J., Stanley, K., Bapela, N. B., Hoal, E., Parida, S., van Helden, P., & Walzl, G. (2008). An Evaluation of Commercial Fluorescent Bead-Based Luminex Cytokine Assays. *PLoS ONE*, 3, e2535.
- Dong, C., Fu, T., Ji, J., Li, Z., & Gu, Z. (2018). The role of interleukin-4 in rheumatic diseases. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 45, 747–754.
- Dragun, D., Distler, J. H. W., Riemekasten, G., & Distler, O. (2009). Stimulatory autoantibodies to platelet-derived growth factor receptors in systemic sclerosis: what functional autoimmunity could learn from receptor biology. *Arthritis and Rheumatism*, 60, 907–911.
- Du, Y., Yan, L., Du, H., Wang, L., Ding, F., Quan, L., Cheng, X., Song, K., & Liu, H. (2012).  $\beta$ 1-Adrenergic Receptor Autoantibodies From Heart Failure Patients Enhanced TNF- $\alpha$  Secretion in RAW264.7 Macrophages in a Largely PKA-Dependent Fashion. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113, 3218–3228.
- Du, Y., Yan, L., Wang, J., Zhan, W., Song, K., Han, X., Li, X., Cao, J., & Liu, H. (2012).  $\beta$ 1-Adrenoceptor Autoantibodies from DCM Patients Enhance the Proliferation of T Lymphocytes through the  $\beta$ 1-AR/cAMP/PKA and p38 MAPK Pathways. *PLoS ONE*, 7, e52911.
- Elhai, M., Meune, C., Boubaya, M., Avouac, J., Hachulla, E., Balbir-Gurman, A., Riemekasten, G.,

- Airò, P., Joven, B., Vettori, S., Cozzi, F., Ullman, S., Cziráj, L., Tikly, M., Müller-Ladner, U., Caramaschi, P., Distler, O., Iannone, F., Ananieva, L. P., ... Allanore, Y. (2017). Mapping and predicting mortality from systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *76*, 1897–1905.
- Elhai, M., Avouac, J., Walker, U. A., Matucci-Cerinic, M., Riemekasten, G., Airò, P., Hachulla, E., Valentini, G., Carreira, P. E., Cozzi, F., Balbir Gurman, A., Braun-Moscovici, Y., Damjanov, N., Ananieva, L. P., Scorza, R., Jimenez, S., Busquets, J., Li, M., Müller-Ladner, U., ... Allanore, Y. & EUSTAR co-authors (2016). A gender gap in primary and secondary heart dysfunctions in systemic sclerosis: a EUSTAR prospective study. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *75*, 163–169.
- Falkenburg, W. J. J., van Schaardenburg, D., Ooijevaar-de Heer, P., Tsang-A-Sjoe, M. W. P., Bultink, I. E. M., Voskuyl, A. E., Bentlage, A. E. H., Vidarsson, G., Wolbink, G., & Rispen, T. (2017). Anti-Hinge Antibodies Recognize IgG Subclass- and Protease-Restricted Neopeptides. *The Journal of Immunology*, *198*, 82–93.
- Famularo, G., Procopio, A., Giacomelli, R., Danese, C., Sacchetti, S., Perego, M. A., Santoni, A., & Tonietti, G. (1990). Soluble interleukin-2 receptor, interleukin-2 and interleukin-4 in sera and supernatants from patients with progressive systemic sclerosis. *Clinical and Experimental Immunology*, *81*, 368–372.
- Firestein, G. S., & McInnes, I. B. (2017). Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity*, *46*, 183–196.
- Frantz, C., Auffray, C., Avouac, J., & Allanore, Y. (2018). Regulatory T Cells in Systemic Sclerosis. *Frontiers in Immunology*, *9*, 2356.
- Gabrielli, A., Avvedimento, E. V., & Krieg, T. (2009). Scleroderma. *The New England Journal of Medicine*, *360*, 1989–2003.
- García-Martínez, A., Hernández-Rodríguez, J., Espígol-Frigolé, G., Prieto-González, S., Butjosa, M., Segarra, M., Lozano, E., & Cid, M. C. (2010). Clinical Relevance of Persistently Elevated Circulating Cytokines (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  and Interleukin-6) in the Long-Term Followup of Patients With Giant Cell Arteritis. *Arthritis Care & Research*, *62*, 835–841.
- Gonzalez-Gay, M. A., Vazquez-Rodriguez, T. R., Lopez-Diaz, M. J., Miranda-Filloo, J. A., Gonzalez-Juanatey, C., Martin, J., & Llorca, J. (2009). Epidemiology of Giant Cell Arteritis and Polymyalgia Rheumatica. *Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research)*, *61*, 1454–1461.
- Graßhoff, H., Comdühr, S., Monne, L. R., Müller, A., Lamprecht, P., Riemekasten, G., & Humrich, J. Y. (2021). Low-Dose IL-2 Therapy in Autoimmune and Rheumatic Diseases. *Frontiers in Immunology*, *12*, 648408.
- Graver, J. C., Abdulahad, W., van der Geest, K. S. M., Heeringa, P., Boots, A. M. H., Brouwer, E., & Sandovici, M. (2021). Association of the CXCL9-CXCR3 and CXCL13-CXCR5 axes with B-cell trafficking in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Journal of Autoimmunity*, *123*, 102684.
- Groom, J. R., & Luster, A. D. (2011). CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunology and Cell Biology*, *89*, 207–215.
- Guiducci, S., Distler, O., Distler, J. H. W., & Matucci-Cerinic, M. (2008). Mechanisms of vascular damage in SSc - implications for vascular treatment strategies. *Rheumatology (Oxford)*, *47*, v18–v20.
- Günther, J., Kill, A., Becker, M. O., Heidecke, H., Rademacher, J., Siegert, E., Radić, M., Burmester, G.-R., Dragun, D., & Riemekasten, G. (2014). Angiotensin receptor type 1 and endothelin receptor type A on immune cells mediate migration and the expression of IL-8 and CCL18 when stimulated by autoantibodies from systemic sclerosis patients. *Arthritis Research & Therapy*, *16*, R65.

- Hauser, A. S., Attwood, M. M., Rask-Andersen, M., Schiöth, H. B., & Gloriam, D. E. (2017). Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nature Reviews Drug Discovery*, *16*, 829–842.
- Hellmich, B., Agueda, A., Monti, S., Buttgereit, F., de Boysson, H., Brouwer, E., Cassie, R., Cid, M. C., Dasgupta, B., Dejaco, C., Hatemi, G., Hollinger, N., Mahr, A., Mollan, S. P., Mukhtyar, C., Ponte, C., Salvarani, C., Sivakumar, R., Tian, X., ... Luqmani, R. A. (2020). 2018 Update of the EULAR recommendations for the management of large vessel vasculitis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *79*, 19–30.
- Huang, X.-L., Wang, Y.-J., Yan, J.-W., Wan, Y.-N., Chen, B., Li, B.-Z., Yang, G.-J., & Wang, J. (2015). Role of anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-13 in systemic sclerosis. *Inflammation Research*, *64*, 151–159.
- Hughes, M., Pauling, J. D., Armstrong-James, L., Denton, C. P., Galdas, P. & Flurey, C. (2020). Gender-related differences in systemic sclerosis. *Autoimmunity Reviews*, *19*, 102494.
- Humrich, J. Y., von Spee-Mayer, C., Siegert, E., Alexander, T., Hiepe, F., Radbruch, A., Burmester, G.-R., & Riemekasten, G. (2015). Rapid induction of clinical remission by low-dose interleukin-2 in a patient with refractory SLE. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *74*, 791–792.
- Hunder, G. G., Bloch, D. A., Michel, B. A., Stevens, M. B., Arend, W. P., Calabrese, L. H., Edworthy, S. M., Fauci, A. S., Leavitt, R. Y., Lie, J. T., Lightfoot, R. W. J., Masi, A. T., McShane, D. J., Mills, J. A., Wallace, S. L., & Zvaifler, N. J. (1990). The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of giant cell arteritis. *Arthritis and Rheumatism*, *33*, 1122–1128.
- Ishihara, K., & Hirano, T. (2002). IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *13*, 357–368.
- Jacoby, E., Bouhelal, R., Gerspacher, M., & Seuwen, K. (2006). The 7TM G-protein-coupled receptor target family. *ChemMedChem*, *1*, 760–782.
- Jaeger, V. K., Wirz, E. G., Allanore, Y., Rossbach, P., Riemekasten, G., Hachulla, E., Distler, O., Airò, P., Carreira, P. E., Gurman, A. B., Tikly, M., Vettori, S., Damjanov, N., Müller-Ladner, U., Distler, J. H. W., Li, M., Walker, U. A., & EUSTAR Co-Authors. (2016). Incidences and Risk Factors of Organ Manifestations in the Early Course of Systemic Sclerosis: A Longitudinal EUSTAR Study. *PLoS ONE*, *11*, e0163894.
- Jäger, E., Murthy, S., Schmidt, C., Hahn, M., Strobel, S., Peters, A., Stäubert, C., Sungur, P., Venus, T., Geisler, M., Radusheva, V., Raps, S., Rothe, K., Scholz, R., Jung, S., Wagner, S., Pierer, M., Seifert, O., Chang, W., ... Wagner, U. (2020). Calcium-sensing receptor-mediated NLRP3 inflammasome response to calciprotein particles drives inflammation in rheumatoid arthritis. *Nature Communications*, *11*, 4243.
- Jennette, J. C., Falk, R. J., Bacon, P. A., Basu, N., Cid, M. C., Ferrario, F., Flores-Suarez, L. F., Gross, W. L., Guillevin, L., Hagen, E. C., Hoffman, G. S., Jayne, D. R., Kallenberg, C. G. M., Lamprecht, P., Langford, C. A., Luqmani, R. A., Mahr, A. D., Matteson, E. L., Merkel, P. A., ... Watts, R. A. (2013). 2012 Revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis & Rheumatism*, *65*, 1–11.
- Kahaleh, M. B., & LeRoy, E. C. (1999). Autoimmunity and Vascular Involvement in Systemic Sclerosis (SSc). *Autoimmunity*, *31*, 195–214.
- Kang, S., Narazaki, M., Metwally, H., & Kishimoto, T. (2020). Historical overview of the interleukin-6 family cytokine. *Journal of Experimental Medicine*, *217*, e20190347.
- Kang, S., Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2019). Targeting Interleukin-6 Signaling in Clinic. *Immunity*, *50*, 1007–1023.
- Khan, K., Xu, S., Nihtyanova, S., Derrett-Smith, E., Abraham, D., Denton, C. P., & Ong, V. H. (2012). Clinical and pathological significance of interleukin 6 overexpression in systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *71*, 1235–1242.

- Kill, A., Tabeling, C., Undeutsch, R., Kühl, A. A., Günther, J., Radic, M., Becker, M. O., Heidecke, H., Worm, M., Witzenth, M., Burmester, G.-R., Dragun, D., & Riemekasten, G. (2014). Autoantibodies to angiotensin and endothelin receptors in systemic sclerosis induce cellular and systemic events associated with disease pathogenesis. *Arthritis Research & Therapy*, *16*, R29.
- Kitas, G. D., & Gabriel, S. E. (2011). Cardiovascular disease in rheumatoid arthritis: state of the art and future perspectives. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *70*, 8–14.
- Klapa, S., Müller, A., Koch, A., Heidecke, H., Kähler, W., Junker, J., Schinke, S., Riemekasten, G., & Lamprecht, P. (2019). Decreased endothelin receptor A autoantibody levels are associated with early ischaemic events in patients with giant-cell arteritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *78*, 1443–1444.
- Klatzmann, D., & Abbas, A. K. (2015). The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. *Nature Reviews Immunology*, *15*, 283–294.
- Koch, A. E. (2005). Chemokines and Their Receptors in Rheumatoid Arthritis: Future Targets? *Arthritis & Rheumatism*, *52*, 710–721.
- Kowal-Bielecka, O., Fransen, J., Avouac, J., Becker, M., Kulak, A., Allanore, Y., Distler, O., Clements, P., Cutolo, M., Czirjak, L., Damjanov, N., del Galdo, F., Denton, C. P., Distler, J. H. W., Foeldvari, I., Figelstone, K., Frerix, M., Furst, D. E., Guiducci, S., ... EUSTAR Co-Authors. (2017). Update of EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *76*, 1327–1339.
- Kubo, S., Smith, V., Cutolo, M., & Tanaka, Y. (2018). The role of nailfold videocapillaroscopy in patients with systemic sclerosis. *Immunological Medicine*, *41*, 113–119.
- Labarca, C., Koster, M. J., Crowson, C. S., Makol, A., Ytterberg, S. R., Matteson, E. L., & Warrington, K. J. (2016). Predictors of relapse and treatment outcomes in biopsy-proven giant cell arteritis: a retrospective cohort study. *Rheumatology (Oxford)*, *55*, 347–356.
- Li, B., Guo, Q., Wang, Y., Su, R., Gao, C., Zhao, J., Li, X., & Wang, C. (2020). Increased Serum Interleukin-2 Levels Are Associated with Abnormal Peripheral Blood Natural Killer Cell Levels in Patients with Active Rheumatoid Arthritis. *Mediators of Inflammation*, *2020*, 6108342.
- Li, T., Sun, M., Yin, X., Wu, C., Wu, Q., Feng, S., Li, H., Luan, Y., Wen, J., Yan, L., Zhao, B., Xu, C., & Sun, Y. (2013). Expression of the calcium sensing receptor in human peripheral blood T lymphocyte and its contribution to cytokine secretion through MAPKs or NF- $\kappa$ B pathways. *Molecular Immunology*, *53*, 414–420.
- Lin, Y.-J., Anzaghe, M., & Schülke, S. (2020). Update on the Pathomechanism, Diagnosis, and Treatment Options for Rheumatoid Arthritis. *Cells*, *9*, 880.
- Loebel, M., Grabowski, P., Heidecke, H., Bauer, S., Hanitsch, L. G., Wittke, K., Meisel, C., Reinke, P., Volk, H.-D., Fluge, Ø., Mella, O., & Scheibenbogen, C. (2016). Antibodies to  $\beta$  adrenergic and muscarinic cholinergic receptors in patients with Chronic Fatigue Syndrome. *Brain, Behavior, and Immunity*, *52*, 32–39.
- Lopez, E., Scott, N. E., Wines, B. D., Hogarth, P. M., Wheatley, A. K., Kent, S. J., & Chung, A. W. (2019). Low pH Exposure During Immunoglobulin G Purification Methods Results in Aggregates That Avidly Bind Fc $\gamma$  Receptors: Implications for Measuring Fc Dependent Antibody Functions. *Frontiers in Immunology*, *10*, 2415.
- López, M. L., Soriano-Sarabia, N., Bruges, G., Marquez, M. E., Preissner, K. T., Schmitz, M. L., & Hackstein, H. (2014). Expression pattern of protease activated receptors in lymphoid cells. *Cellular Immunology*, *288*, 47–52.
- Ludwig, R. J., Vanhoorelbeke, K., Leypoldt, F., Kaya, Z., Bieber, K., McLachlan, S. M., Komorowski, L., Luo, J., Cabral-Marques, O., Hammers, C. M., Lindstrom, J. M., Lamprecht, P., Fischer, A., Riemekasten, G., Tersteeg, C., Sondermann, P., Rapoport, B., Wandinger, K.-

- P., Probst, C., ... Nimmerjahn, F. (2017). Mechanisms of Autoantibody-Induced Pathology. *Frontiers in Immunology*, 8, 603.
- Makino, T., & Jinnin, M. (2016). Genetic and epigenetic abnormalities in systemic sclerosis. *Journal of Dermatology*, 43, 10–18.
- Malek, T. R., & Bayer, A. L. (2004). Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nature Reviews Immunology*, 4, 665–674.
- Mannik, M., & Nardella, F. A. (1985). IgG rheumatoid factors and self-association of these antibodies. *Clinics in Rheumatic Diseases*, 11, 551–572.
- Marino, F., & Cosentino, M. (2013). Adrenergic modulation of immune cells: an update. *Amino Acids*, 45, 55–71.
- McInnes, I. B., & Schett, G. (2011). The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *The New England Journal of Medicine*, 365, 2205–2219.
- McIntosh, K. A., Cunningham, M. R., Bushell, T., & Plevin, R. (2020). The development of proteinase-activated receptor-2 modulators and the challenges involved. *Biochemical Society Transactions*, 48, 2525–2537.
- Meier, F. M. P., Frommer, K. W., Dinser, R., Walker, U. A., Czirjak, L., Denton, C. P., Allano, Y., Distler, O., Riemekasten, G., Valentini, G., Müller-Ladner, U., & EUSTAR Co-Authors. (2012). Update on the profile of the EUSTAR cohort: an analysis of the EULAR Scleroderma Trials and Research group database. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 71, 1355–1360.
- Meyer, C., & Heidecke, H. (2018). Antibodies against GPCR. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 23, 2177–2194.
- Mierau, R., Moizadeh, P., Riemekasten, G., Melchers, I., Meurer, M., Reichenberger, F., Buslau, M., Worm, M., Blank, N., Hein, R., Müller-Ladner, U., Kuhn, A., Sunderkötter, C., Juche, A., Pfeiffer, C., Fiehn, C., Sticherling, M., Lehmann, P., Stadler, R., ... Hunzelmann, N. (2011). Frequency of disease-associated and other nuclear autoantibodies in patients of the German network for systemic scleroderma: correlation with characteristic clinical features. *Arthritis Research & Therapy*, 13, R172.
- Mimura, Y., Ihn, H., Jinnin, M., Asano, Y., Yamane, K., Yazawa, N., & Tamaki, K. (2004). Rheumatoid factor isotypes and anti-agalactosyl IgG antibodies in systemic sclerosis. *British Journal of Dermatology*, 151, 803–808.
- Misra, D. P., Ahmed, S., & Agarwal, V. (2020). Is biological therapy in systemic sclerosis the answer? *Rheumatology International*, 40, 679–694.
- Mthembu, S. N., Sharma, A., Albericio, F., & de la Torre, B. G. (2020). Breaking a Couple: Disulfide Reducing Agents. *ChemBioChem*, 21, 1947–1954.
- Mukherjee, M., & Nair, P. (2018). Autoimmune Responses in Severe Asthma. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 10, 428–447.
- Murthy, S., Wannick, M., Eleftheriadis, G., Müller, A., Luo, J., Busch, H., Dalmann, A., Riemekasten, G., & Sadik, C. D. (2021). Immunoglobulin G of systemic sclerosis patients programs a pro-inflammatory and profibrotic phenotype in monocyte-like THP-1 cells. *Rheumatology (Oxford)*, 60, 3012–3022.
- Myasoedova, E., Crowson, C. S., Kremers, H. M., Therneau, T. M., & Gabriel, S. E. (2010). Is the incidence of rheumatoid arthritis rising? Results from Olmsted County, Minnesota, 1955-2007. *Arthritis & Rheumatism*, 62, 1576–1582.
- Nagaraja, V., Denton, C. P., & Khanna, D. (2015). Old medications and new targeted therapies in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*, 54, 1944–1953.
- Nagele, E. P., Han, M., Acharya, N. K., DeMarshall, C., Kosciuk, M. C., & Nagele, R. G. (2013). Natural IgG Autoantibodies Are Abundant and Ubiquitous in Human Sera, and Their Number Is Influenced By Age, Gender, and Disease. *PLoS ONE*, 8, e60726.
- Nanki, T., Takada, K., Komano, Y., Morio, T., Kanegane, H., Nakajima, A., Lipsky, P. E., &

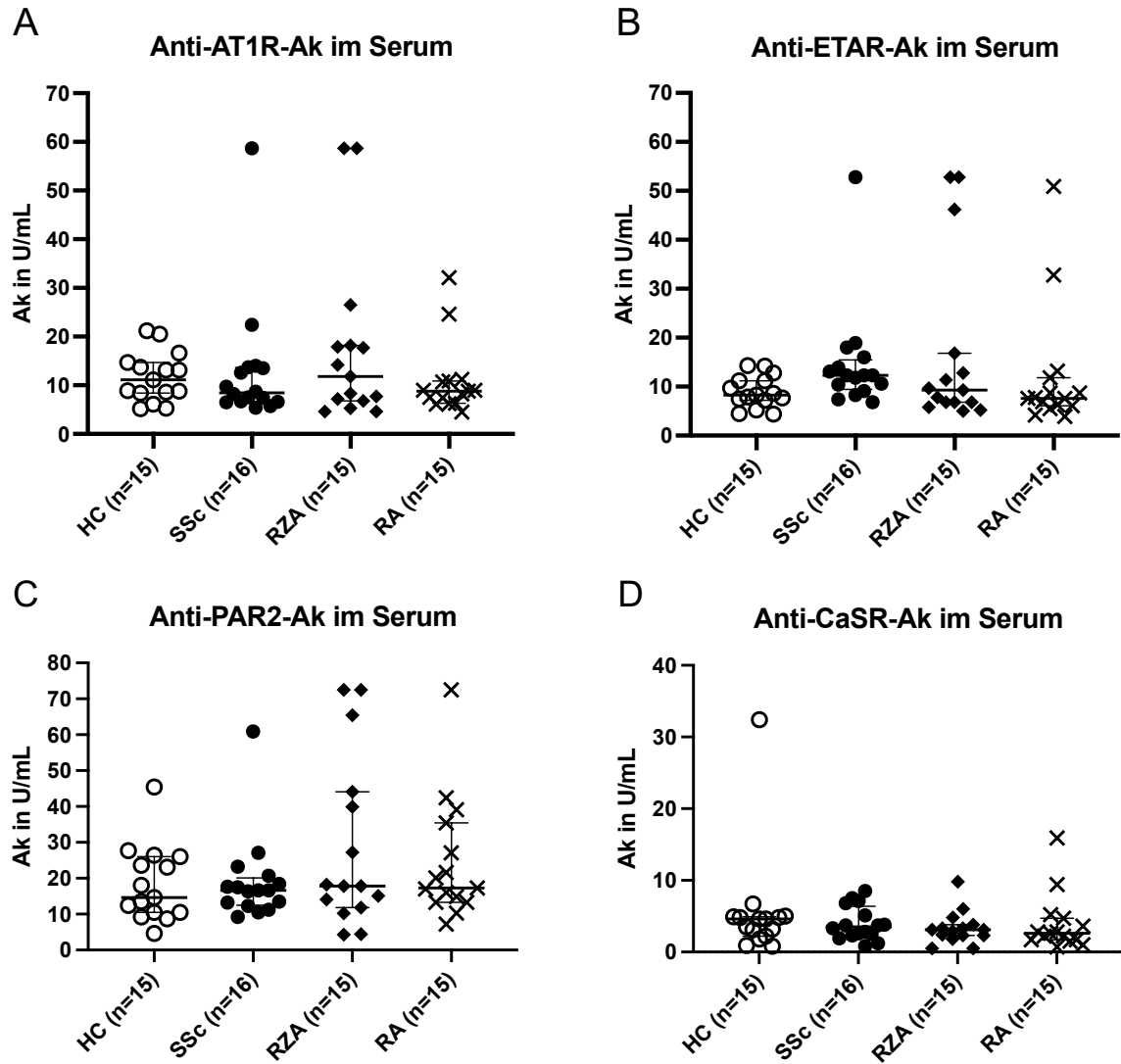
- Miyasaka, N. (2009). Chemokine receptor expression and functional effects of chemokines on B cells: implication in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, *11*, R149.
- Needleman, B. W., Wigley, F. M., & Stair, R. W. (1992). Interleukin-1, Interleukin-2, Interleukin-4, Interleukin-6, Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ , and Interferon- $\gamma$  Levels in Sera from Patients With Scleroderma. *Arthritis and Rheumatism*, *35*, 67–72.
- Nimmerjahn, F., & Ravetch, J. V. (2008). Fc $\gamma$  receptors as regulators of immune responses. *Nature Reviews Immunology*, *8*, 34–47.
- Nowakowski, A. B., Wobig, W. J., & Petering, D. H. (2014). Native SDS-PAGE: High resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. *Metallomics*, *6*, 1068–1078.
- Paccou, J., Boudot, C., Mary, A., Kamel, S., Drüeke, T. B., Fardellone, P., Massy, Z., Brazier, M., & Mentaverri, R. (2013). Determination and Modulation of Total and Surface Calcium-Sensing Receptor Expression in Monocytes In Vivo and In Vitro. *PLoS ONE*, *8*, e74800.
- Paolini, C., Agarbati, S., Benfaremo, D., Mozzicafreddo, M., Svegliati, S., & Moroncini, G. (2022). PDGF / PDGFR : A Possible Molecular Target in Scleroderma Fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*, 3904.
- Pauling, J. D., Hughes, M., & Pope, J. E. (2019). Raynaud's phenomenon—an update on diagnosis, classification and management. *Clinical Rheumatology*, *38*, 3317–3330.
- Peoples, C., Medsger, T. A., Jr., Lucas, M., Rosario, B. L. & Feghali-Bostwick, C. A. (2016). Gender differences in systemic sclerosis: relationship to clinical features, serological status and outcomes. *Journal of Scleroderma and Related Disorders*, *1*, 177–240.
- Pham, N. B., & Meng, W. S. (2020). Protein aggregation and immunogenicity of biotherapeutics. *International Journal of Pharmaceutics*, *585*, 119523.
- Rademacher, J., Kill, A., Mattat, K., Dragun, D., Siegert, E., Günther, J., & Riemekasten, G. (2016). Monocytic Angiotensin and Endothelin Receptor Imbalance Modulate Secretion of the Profibrotic Chemokine Ligand 18. *The Journal of Rheumatology*, *43*, 587–591.
- Riemekasten, G., Petersen, F., & Heidecke, H. (2020). What Makes Antibodies Against G Protein-Coupled Receptors so Special? A Novel Concept to Understand Chronic Diseases. *Frontiers in Immunology*, *11*, 564526.
- Riemekasten, G., Philippe, A., Näther, M., Slowinski, T., Müller, D. N., Heidecke, H., Matucci-Cerinic, M., Czirják, L., Lukitsch, I., Becker, M., Kill, A., van Laar, J. M., Catar, R., Luft, F. C., Burmester, G. R., Hegner, B., & Dragun, D. (2011). Involvement of functional autoantibodies against vascular receptors in systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *70*, 530–536.
- Rose-John, S. (2020). Interleukin-6 signalling in health and disease [version 1; peer review: 3 approved]. *F1000 Research*, *9*, 1013.
- Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. F., & Kobilka, B. K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, *459*, 356–363.
- Rosenstein, S., Vaisman-Mentesh, A., Levy, L., Kigel, A., Dror, Y., & Wine, Y. (2020). Production of F(ab')<sub>2</sub> from monoclonal and polyclonal antibodies. *Current Protocols in Molecular Biology*, *131*, e119.
- Rosenzweig, M., Lorenzon, R., Cacoub, P., Pham, H. P., Pitoiset, F., El Soufi, K., Ribet, C., Bernard, C., Aractingi, S., Banneville, B., Beaugerie, L., Berenbaum, F., Champey, J., Chazouilleres, O., Corpechot, C., Fautrel, B., Mekinian, A., Regnier, E., Saadoun, D., ... Klatzmann, D. (2019). Immunological and clinical effects of low-dose interleukin-2 across 11 autoimmune diseases in a single, open clinical trial. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *78*, 209–217.
- Roumm, A. D., Whiteside, T. L., Medsger, Jr., T. A., & Rodnan, G. P. (1984). Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. Quantification, subtyping, and clinical

- correlations. *Arthritis and Rheumatism*, 27, 645–653.
- Rubio-Rivas, M., Moreno, R., & Corbella, X. (2017). Occupational and environmental scleroderma. Systematic review and meta-analysis. *Clinical Rheumatology*, 36, 569–582.
- Saadoun, D., Vautier, M., & Cacoub, P. (2021). Medium- and Large-Vessel Vasculitis. *Circulation*, 143, 267–282.
- Salvarani, C., Cantini, F., & Hunder, G. G. (2008). Polymyalgia rheumatica and giant-cell arteritis. *The Lancet*, 372, 234–245.
- Samson, M., Greigert, H., Ciudad, M., Gerard, C., Ghesquière, T., Trad, M., Corbera-Bellalta, M., Genet, C., Ouandji, S., Cladière, C., Thebault, M., Ly, K. H., Liozon, E., Maurier, F., Bienvenu, B., Terrier, B., Guillevin, L., Charles, P., Quipourt, V., ... Bonnotte, B. (2021). Improvement of Treg immune response after treatment with tocilizumab in giant cell arteritis. *Clinical & Translational Immunology*, 10, e1332.
- Schaeffer, W. I. (1990). Terminology associated with cell, tissue and organ culture, molecular biology and molecular genetics. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 26, 97–101.
- Scherer, H. U., Häupl, T., & Burmester, G. R. (2020). The etiology of rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmunity*, 110, 102400.
- Schildberger, A., Rossmanith, E., Eichhorn, T., Strassl, K., & Weber, V. (2013). Monocytes, Peripheral Blood Mononuclear Cells, and THP-1 Cells Exhibit Different Cytokine Expression Patterns following Stimulation with Lipopolysaccharide. *Mediators of Inflammation*, 2013, 697972.
- Schinke, S., & Riemekasten, G. (2019). Systemische Sklerose. *Der Internist*, 60, 1251–1269.
- Schmid, I., Krall, W. J., Uittenbogaart, C. H., Braun, J., & Giorgi, J. V. (1992). Dead Cell Discrimination With 7-Amino-Actinomycin D in Combination With Dual Color Immunofluorescence in Single Laser Flow Cytometry. *Cytometry*, 13, 204–208.
- Sharma, A., Mohammad, A. J., & Turesson, C. (2020). Incidence and prevalence of giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica: A systematic literature review. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 50, 1040–1048.
- Shima, Y. (2021). Cytokines Involved in the Pathogenesis of SSc and Problems in the Development of Anti-Cytokine Therapy. *Cells*, 10, 1104.
- Skiba, M. A., & Kruse, A. C. (2021). Autoantibodies as Endogenous Modulators of GPCR Signaling. *Trends in Pharmacological Sciences*, 42, 135–150.
- Smilek, D. E., & St. Clair, E. W. (2015). Solving the puzzle of autoimmunity: critical questions. *F1000Prime Reports*, 7, 17.
- Smolen, J. S., Aletaha, D., & McInnes, I. B. (2016). Rheumatoid arthritis. *The Lancet*, 388, 2023–2038.
- Stone, J. H., Tuckwell, K., Dimonaco, S., Klearman, M., Aringer, M., Blockmans, D., Brouwer, E., Cid, M. C., Dasgupta, B., Rech, J., Salvarani, C., Schett, G., Schulze-Koops, H., Spiera, R., Unizony, S. H., & Collinson, N. (2017). Trial of Tocilizumab in Giant-Cell Arteritis. *The New England Journal of Medicine*, 377, 317–328.
- Tindell, A. G., Kelso, E. B., Ferrell, W. R., Lockhart, J. C., Walsh, D. A., Dunning, L., & McInnes, I. B. (2012). Correlation of protease-activated receptor-2 expression and synovitis in rheumatoid and osteoarthritis. *Rheumatology International*, 32, 3077–3086.
- Tyndall, A. J., Bannert, B., Vonk, M., Airò, P., Cozzi, F., Carreira, P. E., Bancel, D. F., Allanore, Y., Müller-Ladner, U., Distler, O., Iannone, F., Pellerito, R., Pileckyte, M., Miniati, I., Ananieva, L., Gurman, A. B., Damjanov, N., Mueller, A., Valentini, G., ... Walker, U. A. (2010). Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 69, 1809–1815.
- Vallbracht, I., Rieber, J., Oppermann, M., Förger, F., Siebert, U., & Helmke, K. (2004). Diagnostic and clinical value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies compared with rheumatoid

- factor isotypes in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 63, 1079–1084.
- van den Hoogen, F., Khanna, D., Fransen, J., Johnson, S. R., Baron, M., Tyndall, A., Matucci-Cerinic, M., Naden, R. P., Medsger, Jr., T. A., Carreira, P. E., Riemekasten, G., Clements, P. J., Denton, C. P., Distler, O., Allanore, Y., Furst, D. E., Gabrielli, A., Mayes, M. D., van Laar, J. M., ... Pope, J. E. (2013). 2013 Classification Criteria for Systemic Sclerosis: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative. *Arthritis & Rheumatism*, 65, 2737–2747.
- van der Geest, K. S. M., Abdulahad, W. H., Rutgers, A., Horst, G., Bijzet, J., Arends, S., Roffel, M. P., Boots, A. M. H., & Brouwer, E. (2015). Serum markers associated with disease activity in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Rheumatology (Oxford)*, 54, 1397–1402.
- Venkatakrishnan, A. J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C. G., Schertler, G. F., & Babu, M. M. (2013). Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 494, 185–194.
- Wahle, M., Kölker, S., Krause, A., Burmester, G. R., & Baerwald, C. G. O. (2001). Impaired catecholaminergic signalling of B lymphocytes in patients with chronic rheumatic diseases. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 60, 505–510.
- Wallukat, G., & Schimke, I. (2014). Agonistic autoantibodies directed against G-protein-coupled receptors and their relationship to cardiovascular diseases. *Seminars in Immunopathology*, 36, 351–363.
- Wang, L., Wang, F.-S., & Gershwin, M. E. (2015). Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *Journal of Internal Medicine*, 278, 369–395.
- Wang, W., Shao, S., Jiao, Z., Guo, M., Xu, H., & Wang, S. (2012). The Th17/Treg imbalance and cytokine environment in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology International*, 32, 887–893.
- Weigold, F., Günther, J., Pfeiffenberger, M., Cabral-Marques, O., Siegert, E., Dragun, D., Philippe, A., Regensburger, A.-K., Recke, A., Yu, X., Petersen, F., Catar, R., Biesen, R., Hiepe, F., Burmester, G. R., Heidecke, H., & Riemekasten, G. (2018). Antibodies against chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 predict progressive deterioration of lung function in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Research & Therapy*, 20, 52.
- Weis, W. I., & Kobilka, B. K. (2018). The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation. *Annual Review of Biochemistry*, 87, 897–919.
- Weyand, C. M., & Goronzy, J. J. (2013). Immune Mechanisms in Medium and Large Vessel Vasculitis. *Nature Reviews Rheumatology*, 9, 731–740.
- Weyand, C. M., & Goronzy, J. J. (2021). The immunology of rheumatoid arthritis. *Nature Immunology*, 22, 10–18.
- Yamaguchi, T., Olozak, I., Chattopadhyay, N., Butters, R. R., Kifor, O., Scadden, D. T., & Brown, E. M. (1998). Expression of Extracellular Calcium (Ca<sup>2+</sup>)-Sensing Receptor in Human Peripheral Blood Monocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 246, 501–506.
- Yu, X.-Y., Lin, S.-G., Wang, X.-M., Liu, Y., Zhang, B., Lin, Q.-X., Yang, M., & Zhou, S.-F. (2007). Evidence for Coexistence of Three  $\beta$ -Adrenoceptor Subtypes in Human Peripheral Lymphocytes. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 81, 654–658.
- Yue, X., Deng, F., Chen, J., Yin, J., Zheng, J., Chen, Y., Huang, Q., Gao, X., Liu, Z., Luo, J., Müller, A., Heidecke, H., Riemekasten, G., Petersen, F., & Yu, X. (2021). Autoantibodies against C5aR1, C3aR1, CXCR3, and CXCR4 are decreased in primary Sjogren's syndrome. *Molecular Immunology*, 131, 112–120.

## 8. Anhänge

### 8.1 Anti-GPCR-Autoantikörper-Konzentrationen im Serum und in IgG-Fractionen



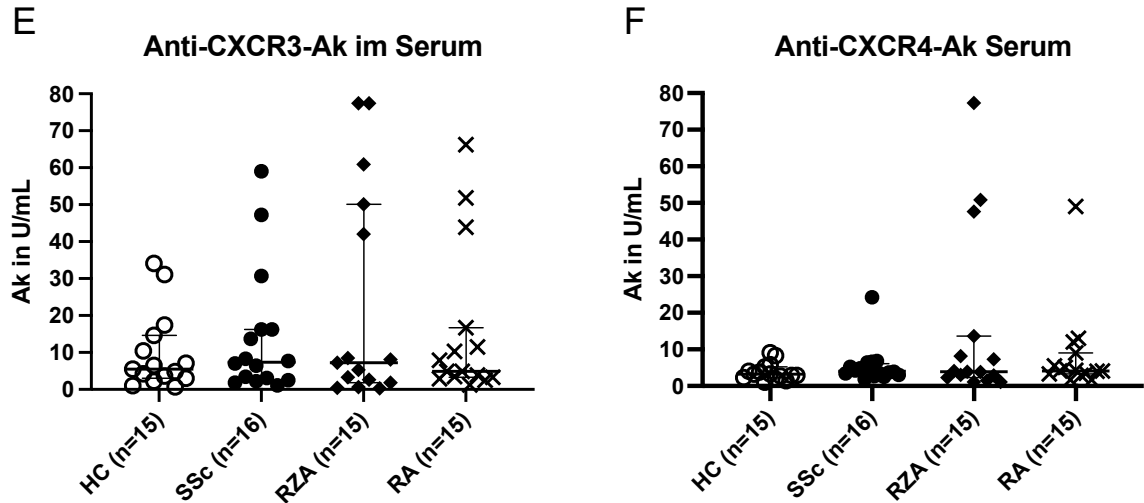
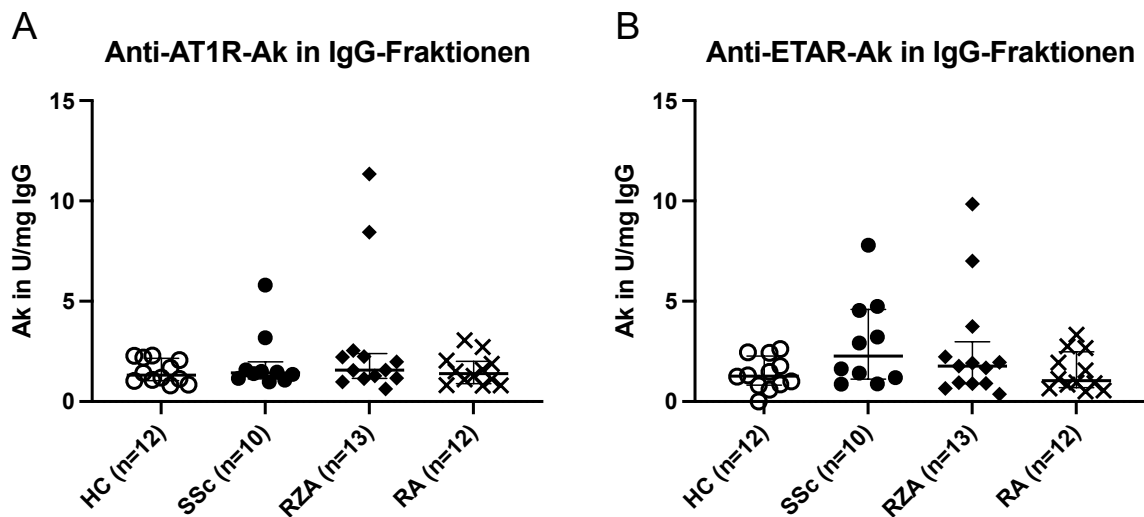


Abbildung 15. Keine Unterschiede der Anti-AT1R-, Anti-ETAR-, Anti-PAR2-, Anti-CaSR-, Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Autoantikörper (Ak)-konzentrationen in Seren von PatientInnen mit Systemischer Sklerose (SSc), Riesenzellarteriitis (RZA) und Rheumatoider Arthritis (RA) sowie gesunden Kontrollen (HC). Gezeigt sind der Median und der Interquartilsabstand. AT1R = Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1, ETAR = Endothelin-Rezeptor Typ A, PAR2 = Protease-aktivierter Rezeptor 2, CaSR = calciumsensitiver Rezeptor, CXCR3 = CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 3, CXCR4 = CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4, U/mL = Units/Milliliter.



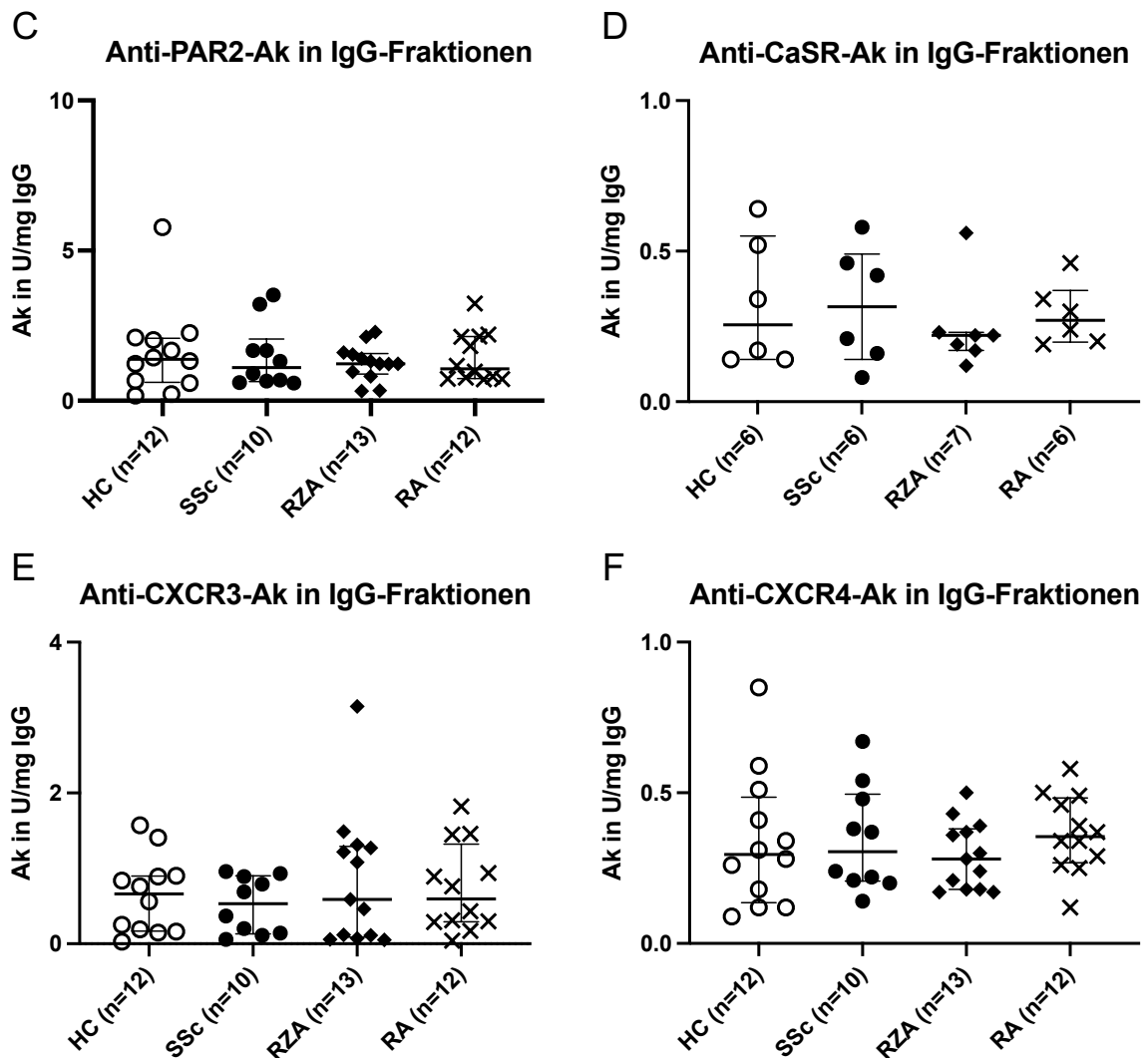
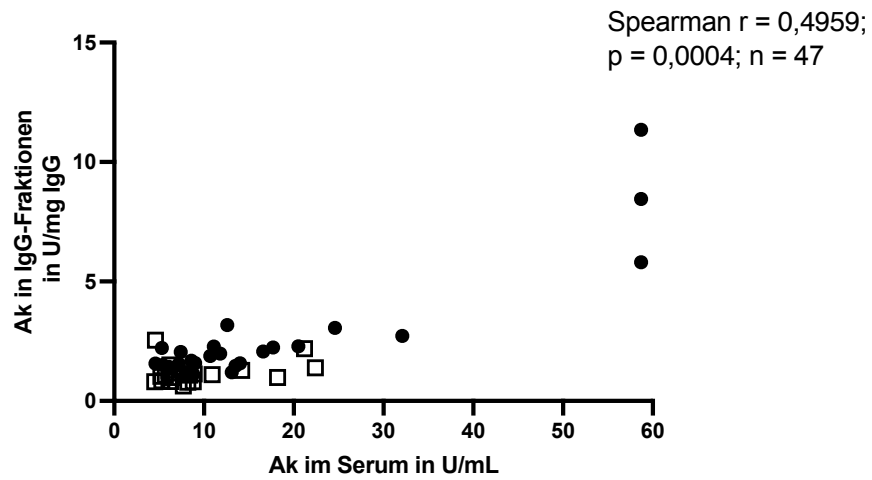


Abbildung 16. Keine Unterschiede der Anti-AT1R-, Anti-ETAR-, Anti-PAR2-, Anti-CaSR-, Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Autoantikörper (Ak)-konzentrationen in aufgereinigten Immunglobulin G (IgG)-Fraktionen aus Seren von PatientInnen mit Systemischer Sklerose (SSc), Riesenzellerarteriitis (RZA) und Rheumatoider Arthritis (RA) sowie gesunden Kontrollen (HC). Gezeigt sind der Median und der Interquartilsabstand. AT1R = Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1, ETAR = Endothelin-Rezeptor Typ A, PAR2 = Protease-aktivierter Rezeptor 2, CaSR = calciumsensitiver Rezeptor, CXCR3 = CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 3, CXCR4 = CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4, U/mg IgG = Units/Milligramm IgG.

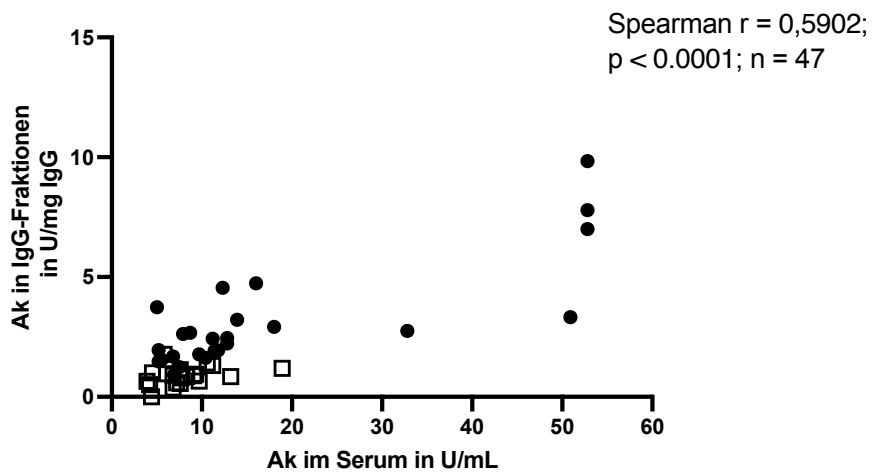
A

Korrelation zwischen Anti-AT1R-Ak im Serum und in den zugehörigen IgG-Fraktionen von SSc-, RZA- und RA-PatientInnen sowie gesunden Kontrollen



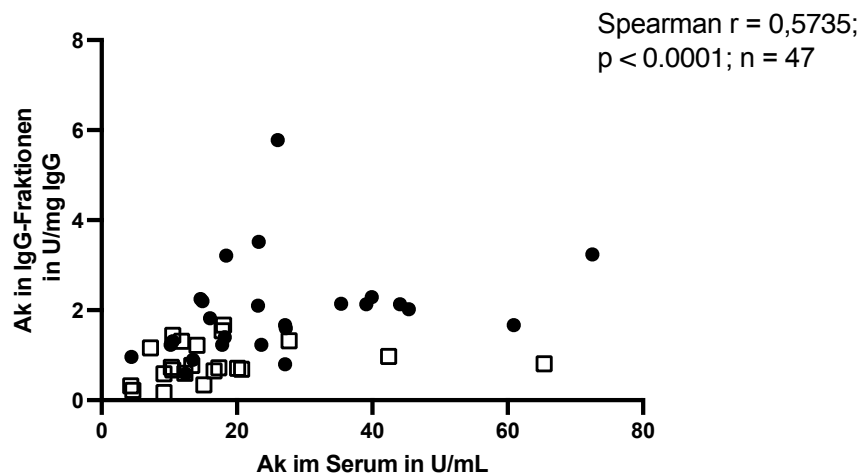
B

Korrelation zwischen Anti-ETAR-Ak im Serum und in den zugehörigen IgG-Fraktionen von SSc-, RZA- und RA-PatientInnen sowie gesunden Kontrollen



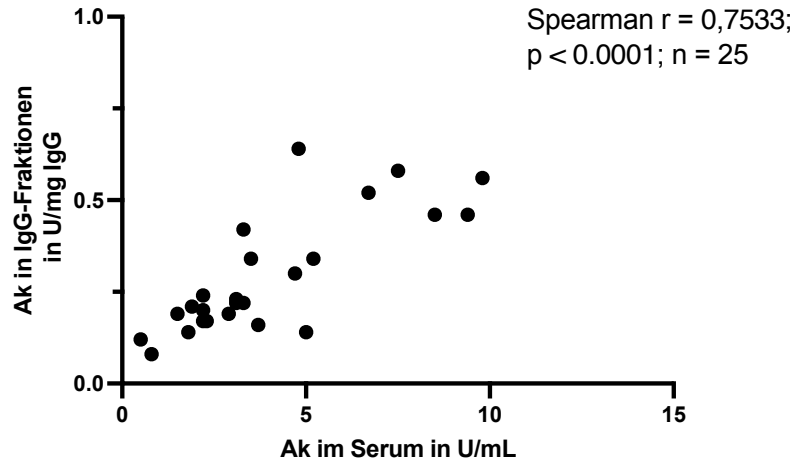
C

Korrelation zwischen Anti-PAR2-Ak im Serum und in den zugehörigen IgG-Fraktionen von SSc-, RZA- und RA-PatientInnen sowie gesunden Kontrollen



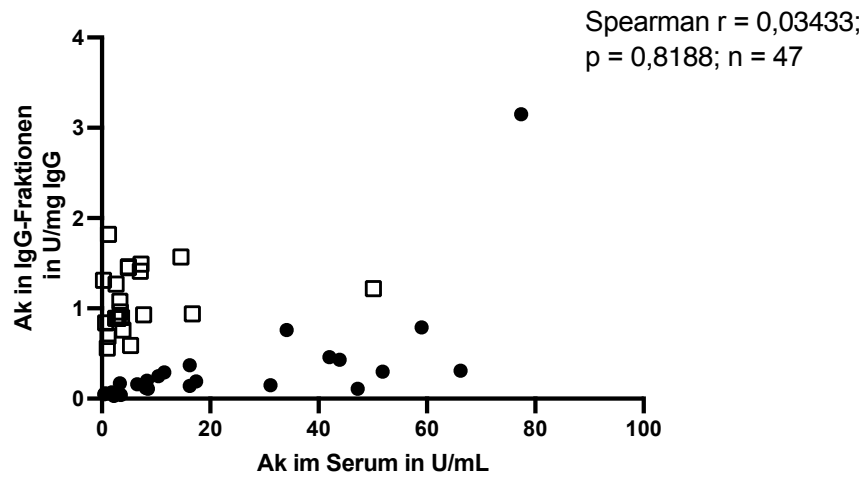
D

Korrelation zwischen Anti-CaSR-Ak im Serum und in den zugehörigen IgG-Frak-tionen von SSc-, RZA- und RA-PatientInnen sowie gesunden Kontrollen



E

Korrelation zwischen Anti-CXCR3-Ak im Serum und in den zugehörigen IgG-Frak-tionen von SSc-, RZA- und RA-PatientInnen sowie gesunden Kontrollen



F

Korrelation zwischen Anti-CXCR4-Ak im Serum und in den zugehörigen IgG-Frak-tionen von SSc-, RZA- und RA-PatientInnen sowie gesunden Kontrollen

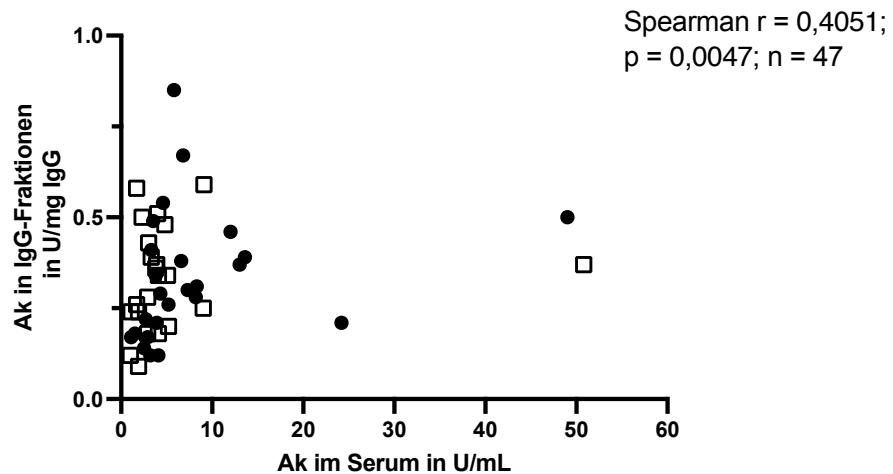
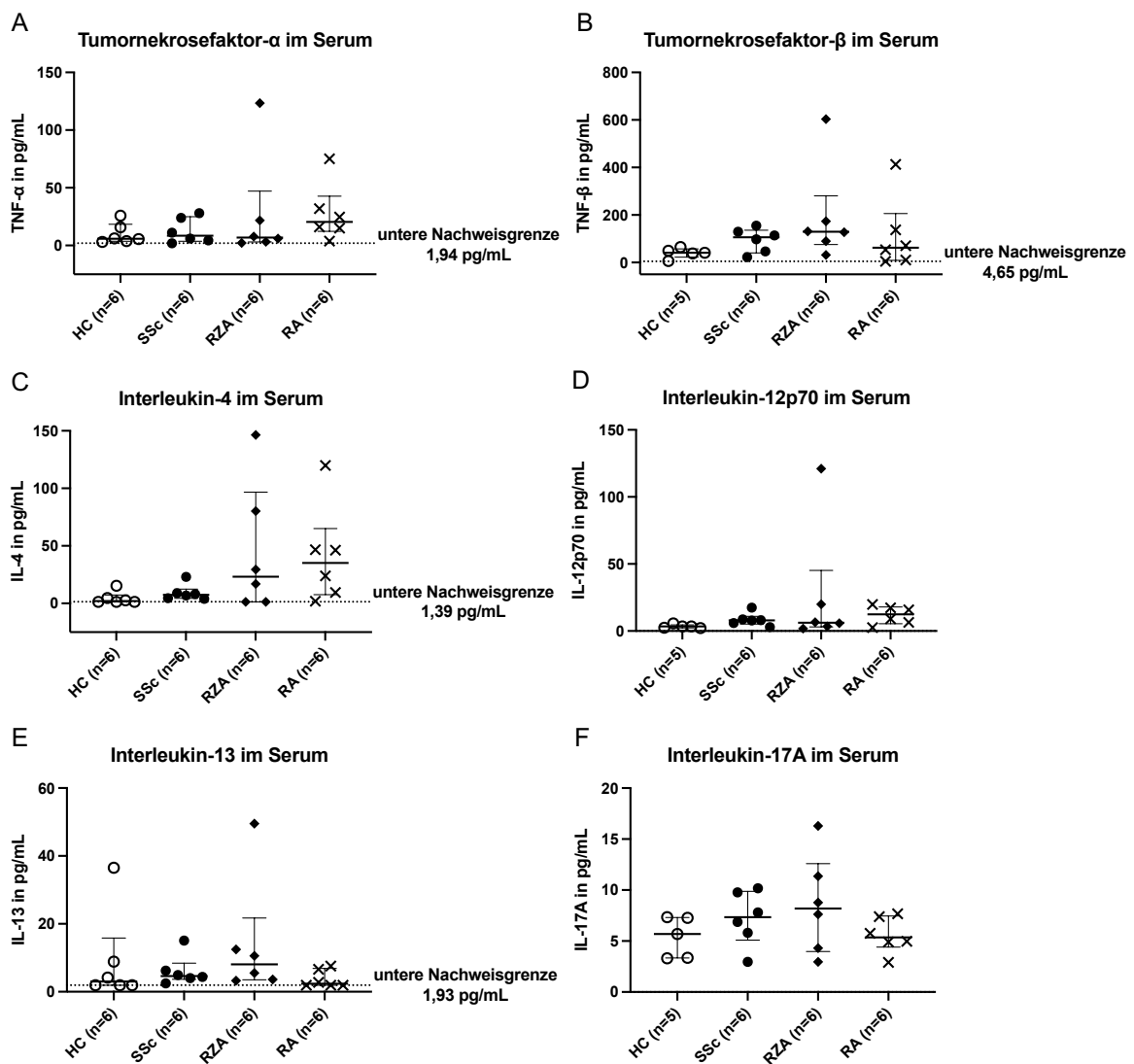


Abbildung 17. Positive Korrelation zwischen den im Serum und in den zugehörigen Immunglobulin G (IgG)-Fraktionen bestimmten Anti-AT1R-, Anti-ETAR-, Anti-PAR2-, Anti-CaSR- und Anti-CXCR4-Autoantikörpern (Ak) sowie keine Korrelation bei Anti-CXCR3-Ak jeweils bei PatientInnen mit Systemischer Sklerose (SSc), Riesenzellarteriitis (RZA) und Rheumatoider Arthritis (RA) sowie gesunden Kontrollen. Wurden die Autoantikörperkonzentrationen in den IgG-Fractionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt, ist dies durch verschiedene Symbole für die Messwerte gekennzeichnet. Korrelationskoeffizient  $r$  nach Spearman. AT1R = Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1, ETAR = Endothelin-Rezeptor Typ A, PAR2 = Protease-aktivierter Rezeptor 2, CaSR = calciumsensitiver Rezeptor, CXCR3 = CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 3, CXCR4 = CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4, U/mg IgG = Units/Milligramm IgG, U/mL = Units/Milliliter.

## 8.2 Zytokinkonzentrationen im Serum



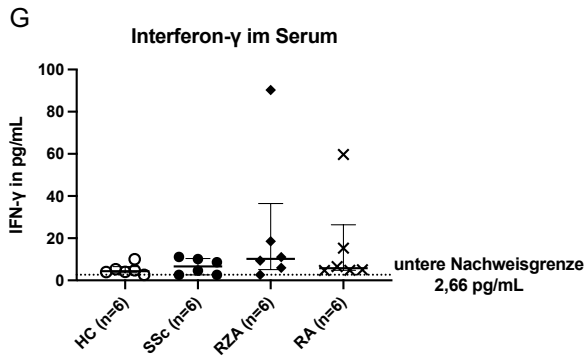
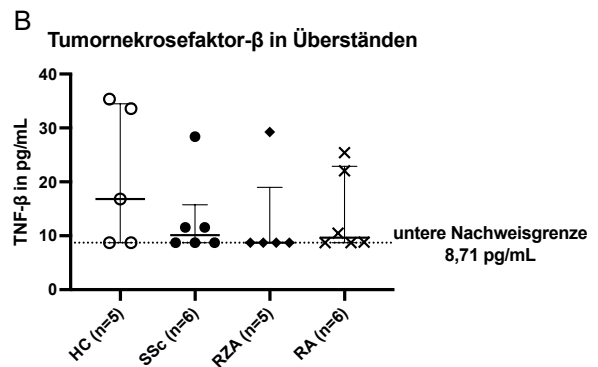
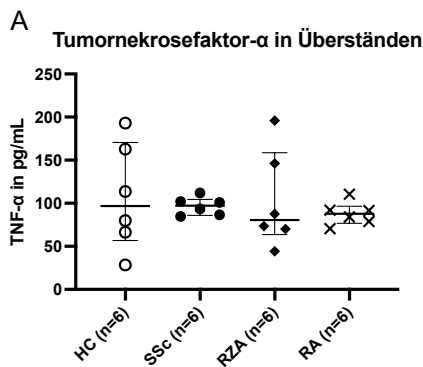


Abbildung 18. Keine Unterschiede von Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), und - $\beta$  (TNF- $\beta$ ), Interleukin (IL)-4, -12p70, -13 und -17A sowie Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) im Serum von PatientInnen mit Systemischer Sklerose (SSc), Riesenzellerarteriitis (RZA) und Rheumatoider Arthritis (RA) bzw. im Serum gesunder Kontrollen (HC). Die gestrichelte Linie zeigt die untere Nachweisgrenze, wenn Werte für das jeweilige Zytokin unter dieser lagen. Dargestellt sind der Median und der Interquartilsabstand. pg/mL = Pikogramm/Milliliter.

### 8.3 Zytokinkonzentrationen in den Überständen nach Stimulation von PBMZ mit IgG



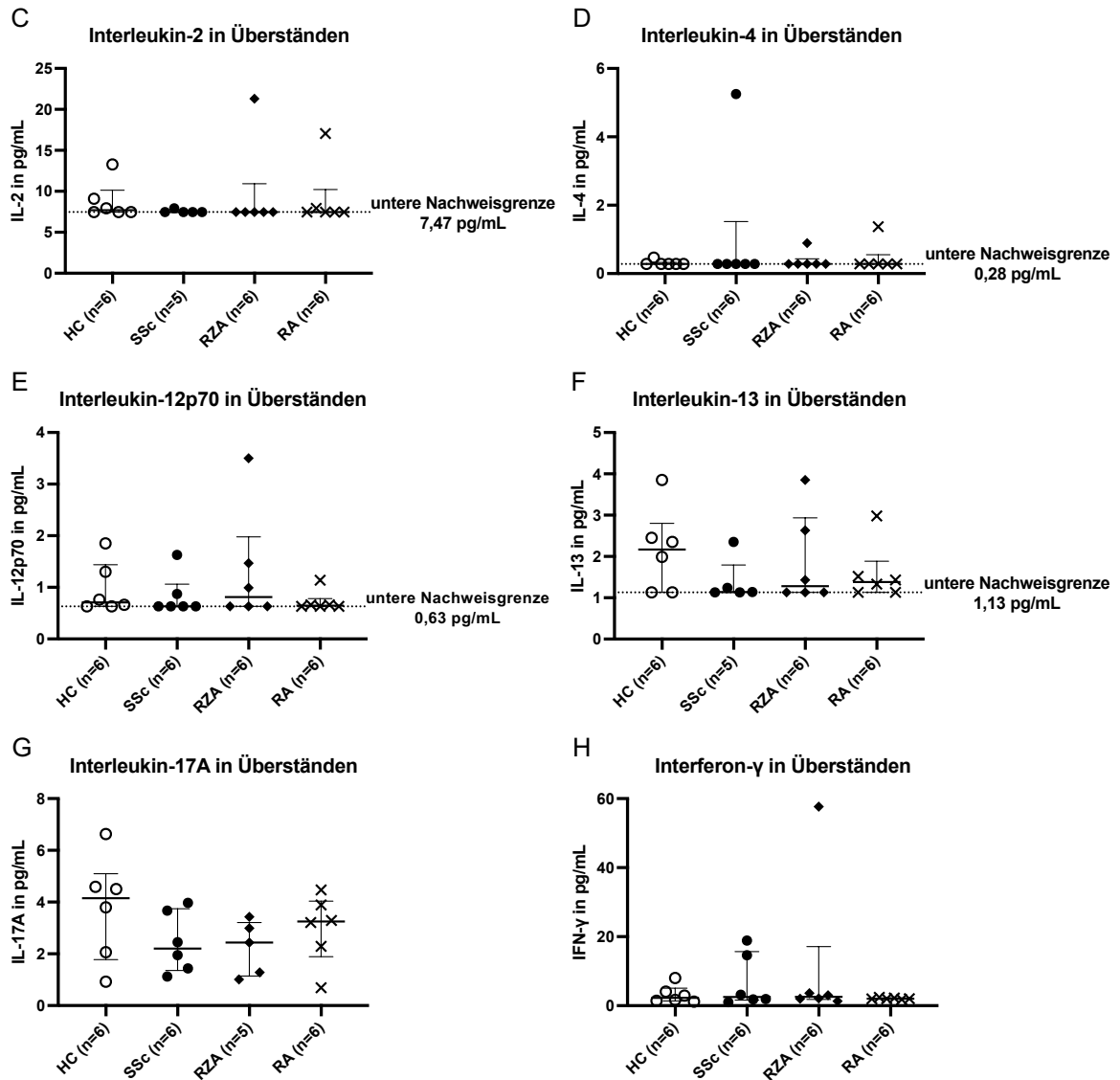


Abbildung 19. Keine Unterschiede der gemessenen Zytokine in den Überständen nach Stimulation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (erster Stimulationsversuch) mit Immunglobulin G (IgG) von PatientInnen mit Systemischer Sklerose (SSc), Riesenzellerarteriitis (RZA) und Rheumatoider Arthritis (RA) bzw. mit IgG von gesunden Kontrollen (HC). Die gestrichelte Linie zeigt die untere Nachweisgrenze, wenn Werte für das jeweilige Zytokin unter dieser lagen. Gezeigt werden der Median und der Interquartilsabstand. TNF- $\alpha$  = Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , TNF- $\beta$  = Tumornekrosefaktor- $\beta$ , IL = Interleukin, IFN- $\gamma$  = Interferon- $\gamma$ . pg/mL = Pikogramm/Milliliter.

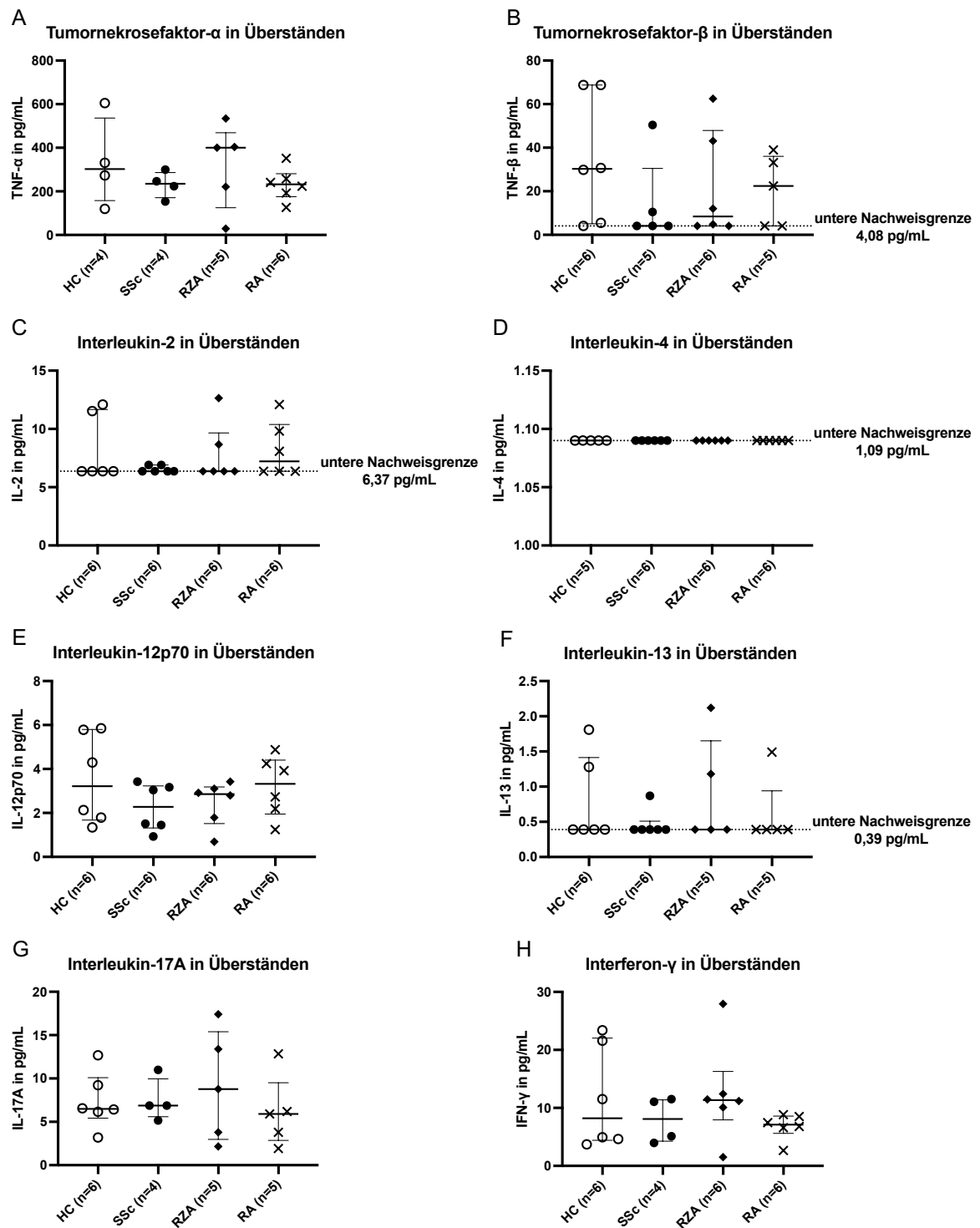


Abbildung 20. Keine Unterschiede der gemessenen Zytokine in den Überständen nach Stimulation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (zweiter Stimulationsversuch) mit Immunglobulin G (IgG) von PatientInnen mit Systemischer Sklerose (SSc), Riesenzellerarteriitis (RZA) und Rheumatoider Arthritis (RA) bzw. mit IgG von gesunden Kontrollen (HC). Die gestrichelte Linie zeigt die untere Nachweisgrenze, wenn Werte für das jeweilige Zytokin unter dieser lagen. Gezeigt werden der Median und der Interquartilsabstand. TNF- $\alpha$  = Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , TNF- $\beta$  = Tumornekrosefaktor- $\beta$ , IL = Interleukin, IFN- $\gamma$  = Interferon- $\gamma$ . pg/mL = Pikogramm/Milliliter.

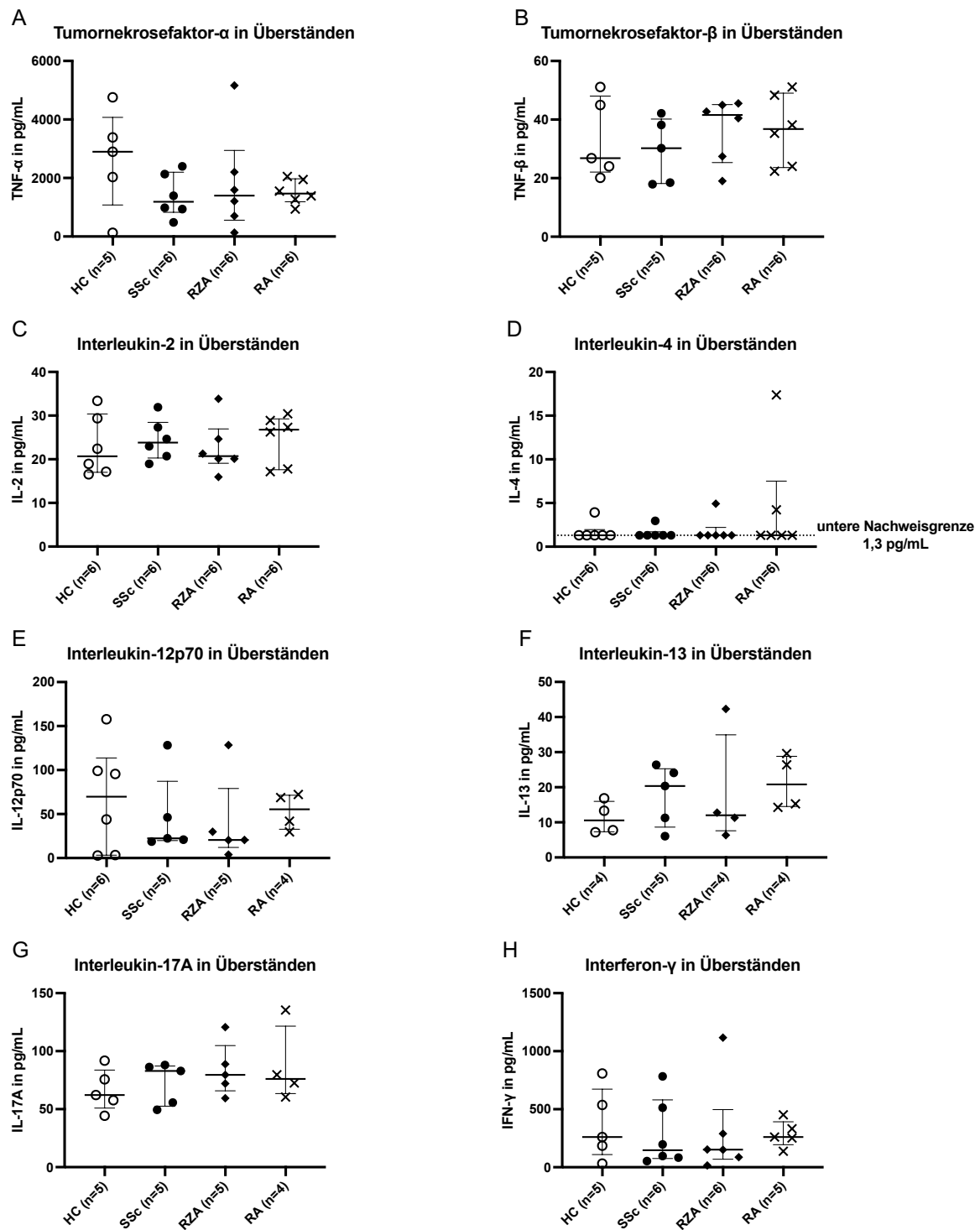


Abbildung 21. Keine Unterschiede der gemessenen Zytokine in den Überständen nach Stimulation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (dritter Stimulationsversuch) mit Immunglobulin G (IgG) von PatientInnen mit Systemischer Sklerose (SSc), Riesenzellerteriitis (RZA) und Rheumatoider Arthritis (RA) bzw. mit IgG von gesunden Kontrollen (HC). Die gestrichelte Linie zeigt die untere Nachweisgrenze, wenn Werte für das jeweilige Zytokin unter dieser lagen. Gezeigt werden der Median und der Interquartilsabstand. TNF- $\alpha$  = Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , TNF- $\beta$  = Tumornekrosefaktor- $\beta$ , IL = Interleukin, IFN- $\gamma$  = Interferon- $\gamma$ . pg/mL = Pikogramm/Milliliter.

## 8.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Immunglobulin G (IgG)-spezifische Banden nach SDS-PAGE der IgG-Eluate erkennbar. ....	42
Abbildung 2. UV-Absorption gemessen von der ÄKTA start während der Immunglobulin G (IgG)-Aufreinigung aus einer Serumprobe.....	43
Abbildung 3. Immunglobulin G (IgG)-spezifische Banden nach SDS-PAGE der Überstände und Präzipitate aus zwei IgG-Eluaten erkennbar. ....	44
Abbildung 4. Unterschiede in mikroskopischen Aufnahmen der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMZ) nach 67-stündiger Kultivierung ohne Zugabe von Fetalem Kälberserum (FKS) (A), mit 1 % FKS (B) und mit 10 % FKS im Kulturmedium (C).....	45
Abbildung 5. Durchflusszytometrische Darstellung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMZ). ....	46
Abbildung 6. Über 90 % der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMZ) nach 67-stündiger Kultivierung vital.....	46
Abbildung 7. Konzentration von Interleukin-6 gemessen in den Überständen nach Stimulation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMZ) mit PMA plus Ionomycin nach 24 und 48 Stunden am höchsten (A); Zytokinausschüttung durch alleinige Zugabe von TruStain (B).....	48
Abbildung 8. Erhöhte Konzentrationen von gegen $\beta_1$ - und $\beta_2$ -Adrenozeptoren (ADR) gerichteten Autoantikörpern (Ak) in Seren von PatientInnen mit Systemischer Sklerose (SSc) im Vergleich zu Seren gesunder Kontrollen (HC) und Seren von PatientInnen mit Riesenzellarteriitis (RZA) und Rheumatoider Arthritis (RA). ....	50
Abbildung 9. Erhöhte Anti- $\beta_1$ - und Anti- $\beta_2$ -Adrenozeptor (ADR)-Autoantikörper (Ak)-Konzentrationen in aufgereinigten Immunglobulin G (IgG)-Fraktionen aus Seren von PatientInnen mit Systemischer Sklerose (SSc) im Vergleich zur Gruppe der gesunden Kontrollen (HC) und der PatientInnen mit Riesenzellarteriitis (RZA) und Rheumatoider Arthritis (RA). ....	50

Abbildung 10. Positive Korrelation zwischen den im Serum und in den zugehörigen Immunglobulin G (IgG)-Fraktionen bestimmten Anti- $\beta_1$ -Adrenozeptor (ADR)-Autoantikörpern (Ak) bei PatientInnen mit Systemischer Sklerose (SSc), Riesenzellarteriitis (RZA) und Rheumatoider Arthritis (RA) sowie gesunden Kontrollen. ....	51
Abbildung 11. Positive Korrelation zwischen den im Serum und in den zugehörigen Immunglobulin G (IgG)-Fraktionen bestimmten Anti- $\beta_2$ -Adrenozeptor (ADR)-Autoantikörpern (Ak) bei PatientInnen mit Systemischer Sklerose (SSc), Riesenzellarteriitis (RZA) und Rheumatoider Arthritis (RA) sowie gesunden Kontrollen. ....	52
Abbildung 12. Keine Unterschiede der Konzentrationen von Interleukin-2 (IL-2) im Serum von gesunden Kontrollen (HC), PatientInnen mit Systemischer Sklerose (SSc), Riesenzellarteriitis (RZA) und Rheumatoider Arthritis (RA). ....	53
Abbildung 13. Erhöhte Konzentrationen von Interleukin-6 (IL-6) im Serum von PatientInnen mit Rheumatoider Arthritis (RA) im Vergleich zur Gruppe der gesunden Kontrollen (HC). ....	54
Abbildung 14. Keine Unterschiede der Interleukin-6 (IL-6)-Konzentration in den Überständen nach Stimulation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes drei verschiedener Spender (A-C) mit Immunglobulin G (IgG) von PatientInnen mit Systemischer Sklerose (SSc), Riesenzellarteriitis (RZA) und Rheumatoider Arthritis (RA) bzw. mit IgG von gesunden Kontrollen (HC). ....	55 - 56
Abbildung 15. Keine Unterschiede der Anti-AT1R-, Anti-ETAR-, Anti-PAR2-, Anti-CaSR-, Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Autoantikörper (Ak)-konzentrationen in Seren von PatientInnen mit Systemischer Sklerose (SSc), Riesenzellarteriitis (RZA) und Rheumatoider Arthritis (RA) sowie gesunden Kontrollen (HC). ....	80 - 81
Abbildung 16. Keine Unterschiede der Anti-AT1R-, Anti-ETAR-, Anti-PAR2-, Anti-CaSR-, Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Autoantikörper (Ak)-konzentrationen in aufgereinigten Immunglobulin G (IgG)-Fraktionen aus Seren von PatientInnen mit Systemischer Sklerose (SSc), Riesenzellarteriitis (RZA) und Rheumatoider Arthritis (RA) sowie gesunden Kontrollen (HC). ....	81 - 82

Abbildung 17. Positive Korrelation zwischen den im Serum und in den zugehörigen Immunglobulin G (IgG)-Fraktionen bestimmten Anti-AT1R-, Anti-ETAR-, Anti-PAR2-, Anti-CaSR- und Anti-CXCR4-Autoantikörpern (Ak) sowie keine Korrelation bei Anti-CXCR3-Ak jeweils bei PatientInnen mit Systemischer Sklerose (SSc), Riesenzellarteriitis (RZA) und Rheumatoider Arthritis (RA) sowie gesunden Kontrollen..... 83 - 85

Abbildung 18. Keine Unterschiede von Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), und - $\beta$  (TNF- $\beta$ ), Interleukin (IL)-4, -12p70, -13 und -17A sowie Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) im Serum von PatientInnen mit Systemischer Sklerose (SSc), Riesenzellarteriitis (RZA) und Rheumatoider Arthritis (RA) bzw. im Serum gesunder Kontrollen (HC). ..... 85 - 86

Abbildung 19. Keine Unterschiede der gemessenen Zytokine in den Überständen nach Stimulation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (erster Stimulationsversuch) mit Immunglobulin G (IgG) von PatientInnen mit Systemischer Sklerose (SSc), Riesenzellarteriitis (RZA) und Rheumatoider Arthritis (RA) bzw. mit IgG von gesunden Kontrollen (HC). ..... 86 - 87

Abbildung 20. Keine Unterschiede der gemessenen Zytokine in den Überständen nach Stimulation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (zweiter Stimulationsversuch) mit Immunglobulin G (IgG) von PatientInnen mit Systemischer Sklerose (SSc), Riesenzellarteriitis (RZA) und Rheumatoider Arthritis (RA) bzw. mit IgG von gesunden Kontrollen (HC). ..... 88

Abbildung 21. Keine Unterschiede der gemessenen Zytokine in den Überständen nach Stimulation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (dritter Stimulationsversuch) mit Immunglobulin G (IgG) von PatientInnen mit Systemischer Sklerose (SSc), Riesenzellarteriitis (RZA) und Rheumatoider Arthritis (RA) bzw. mit IgG von gesunden Kontrollen (HC). ..... 89

## 8.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. ACR/EULAR-Klassifikation der Systemischen Sklerose (SSc) von 2013 nach van den Hoogen <i>et al.</i> (2013). .....	11 - 12
Tabelle 2. Therapieempfehlung zur Behandlung der Systemischen Sklerose (SSc) der <i>European League Against Rheumatism</i> zusammengefasst nach Kowal-Bielecka <i>et al.</i> (2017). .....	13 - 14
Tabelle 3. ACR/EULAR-Klassifikationskriterien der Rheumatoiden Arthritis (RA) von 2010 nach Aletaha <i>et al.</i> (2010). .....	17 - 18
Tabelle 4. Charakterisierung der PatientInnen mit Systemischer Sklerose (SSc), n = 16. ....	25 - 26
Tabelle 5. Charakterisierung der PatientInnen mit Riesenzellerarthritis (RZA), n = 15. ....	26 - 27
Tabelle 6. Charakterisierung der PatientInnen mit Rheumatoider Arthritis (RA), n = 15. ....	27 - 28
Tabelle 7. Charakterisierung der gesunden Kontrollen (HC), n = 15. ....	28 - 29
Tabelle 8. Charakterisierung der gesunden Blut-Spender (HC) zur Gewinnung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMZ). .....	29
Tabelle 9. Verwendete Reagenzien und Puffer. ....	29 - 30
Tabelle 10. Verwendete Verbrauchsmaterialien. ....	30 - 31
Tabelle 11. Verwendete Geräte. ....	31 - 32

## 8.6 Ethikvotum



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Herrn  
Dr. med. Cabral-Marques  
Klinik für Rheumatologie

im Hause

nachrichtlich:

Frau Prof. Dr. med. Riemekasten, Direktorin der Klinik für Rheumatologie

### **Ethik-Kommission**

Vorsitzender:  
Herr Prof. Dr. med. Alexander Katalinic  
Universität zu Lübeck  
Stellv. Vorsitzender:  
Herr Prof. Dr. med. Frank Gieseler  
Ratzeburger Allee 160  
23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann  
Tel.: +49 451 3101 1008  
Fax: +49 451 3101 1024

ethikkommission@uni-luebeck.de

**Aktenzeichen: 16-199**

**Datum: 14. November 2016**

### **Sitzung der Ethik-Kommission am 04. August 2016**

**Antragsteller: Herr Dr. Cabral-Marques**

**Titel: Identifikation und Charakterisierung von neuen Biomarkern bei entzündlichen Systemerkrankungen**

Sehr geehrter Herr Dr. Cabral-Marques,

vielen Dank für Ihr Schreiben vom 09. November 2016, in dem Sie unserem Wunsch nach weiteren Informationen zum Studienvorhaben nachkommen und die überarbeiteten Unterlagen vorlegen.

Die Kommission hat nunmehr keine Bedenken mehr.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden.

Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, ist die Kommission umgehend zu benachrichtigen.

Die Deklaration von Helsinki in der aktuellen Fassung fordert in § 35 dazu auf, jedes medizinische Forschungsvorhaben mit Menschen zu registrieren. Daher empfiehlt die Kommission grundsätzlich die Studienregistrierung in einem öffentlichen Register (z.B. unter [www.drks.de](http://www.drks.de)).

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Studienleiters und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß

Prof. Dr. med. Alexander Katalinic  
Vorsitzender

## 9. Danksagungen

Zuallererst möchte ich Frau Prof. Gabriela Riemekasten für die Überlassung des Forschungsthemas, die Betreuung während der gesamten Promotion und die Einführung in die spannende Welt der Rheumatologie danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau PD Antje Müller für die Unterstützung während der Laborarbeit - und darüber hinaus. Danken möchte ich auch Frau Sara Comdühr für ihre Beratung und Unterstützung über die gesamte Dauer meiner Promotion. Mein Dank gilt ebenso Frau Dr. Anja Kerstein-Stähle, Frau Silke Pitann, Frau Gabriele Marschner, Herrn Alexander Maximilian Hackel sowie Frau Dr. Jiao Luo und dem gesamten Laborteam für die Einarbeitung, Unterstützung und herzliche Aufnahme.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Harald Heidecke und der Firma CellTrend für die Messung der Anti-GPCR-Autoantikörper.

Mein Dank gilt auch der Universität zu Lübeck und dem Graduiertenkolleg 1727, insbesondere Herrn Prof. Frank Petersen für die Unterstützung als Mentor und Herrn Prof. Ralf Ludwig für die Kooperation. Ebenso danke ich Herrn Dr. Georgios Eleftheriadis für den wissenschaftlichen Austausch.

Weiterhin danke ich dem Institut für Medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck für die statistische Beratung.

Außerdem möchte ich meiner Familie, meinem Partner und meinen FreundInnen danken, die immer hinter mir standen und mir stets eine großartige Stütze waren.

Zuletzt möchte ich allen PatientInnen und gesunden Personen danken, die Blut gespendet haben. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.