

**Aus der  
Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie  
der Universität zu Lübeck  
Direktorin: Prof. Dr. med. Gabriela Riemekasten**

**Modulierung der Zytokinsekretion von Immunzellen durch  
Immunglobulin G von Patienten mit Systemischer Sklerose**

**Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck**

**- Aus der Sektion Medizin -**

**vorgelegt von Paulina Mackedanz aus Hamburg**

**Lübeck 2025**

1. Berichterstatterin: PD Dr. Ing. Antje Müller

Kobetreuer: Prof. Dr. med. Karl-Friedrich Klotz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Enno Schmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 16.04.2026

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 17.04.2026

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

## Inhaltsverzeichnis

### 1 Einleitung und Zielsetzung

- 1.1 Kurze klinische Charakterisierung verschiedener Autoimmunerkrankungen
  - 1.1.1 Systemische Sklerose
    - 1.1.1.1 Epidemiologie
    - 1.1.1.2 Ätiologie und Pathogenese
    - 1.1.1.3 Therapie und Prognose
  - 1.1.2 Riesenzellarteriitis
  - 1.1.3 Granulomatose mit Polyangiitis
- 1.2 Ausgewählte Zytokine und ihre Rolle bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen
  - 1.2.1 CCL18 als Marker bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen
  - 1.2.2 TNF- $\alpha$  als Marker bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen
  - 1.2.3 IL-10 als Marker bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen
  - 1.2.4 Zytokinprofil und Zytokinbiomarker bei der SSc
- 1.3 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
  - 1.3.1 Kurze Einführung und Charakterisierung ausgewählter G-Protein-gekoppelter Rezeptoren
  - 1.3.2 Autoantikörper gegen GPCR als potentielle Biomarker und/oder pathogenetische Faktoren bei verschiedenen Erkrankungen
  - 1.3.3 Autoantikörper gegen den  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Adrenorezeptor bei verschiedenen Krankheitsmanifestationen
- 1.4 Assoziationen zwischen zirkulierenden Zytokinen und anti-GPCR-Immunglobulinen bei der Systemischen Sklerose
- 1.5 Zielsetzung

## **2 Material und Methoden**

### 2.1 Material

### 2.2 Auswahl der Probanden

2.2.1 Klinische Charakterisierung der Probanden, von denen IgG aus Serum für den THP-1 Stimulierungsversuch angereichert wurde

2.2.2 Klinische Charakterisierung der Probanden, von denen IgG aus Serum für den PBMC Stimulierungsversuch angereichert wurde

2.2.3 Klinische Charakterisierung der Probanden, von denen IgG aus Serum für den Zytokin Array angereichert wurde

### 2.3 IgG Aufreinigung

### 2.4 Konzentrationsbestimmung der IgG mittels Bradford Assay für Protein/IgG Bestimmung

### 2.5 Zellkultur

2.5.1 THP-1 Zellkultur

2.5.2 PBMC Isolation und Kultur

### 2.6 Stimulierungsversuche

2.6.1 THP-1 Stimulierung

2.6.2 Ermittlung der optimalen Stimulierungsdauer für die PBMC Stimulierung

2.6.3 PBMC Stimulierung

### 2.7 ELISA

2.7.1 Human CCL18/PARC DuoSet ELISA

2.7.2 ELISA Max Standard Set Human TNF- $\alpha$

2.7.3 ELISA Max Standard Set Human IL-10

### 2.8 HEK-Blue™ LPS Detection Kit 2

- 2.9 MycoSPY® Master Mix - PCR Mykoplasmen Test Kit
- 2.10 RayBio® Human Cytokine Antibody Array 5 (G-Series)
- 2.11 Statistische Auswertung

### **3 Ergebnisse**

- 3.1 Die aus humanem Serum aufgereinigten IgG enthalten kein bzw. geringe Mengen an Endotoxin (LPS)
- 3.2 Die Stimulierung von THP-1 Zellen mit HC-IgG, SSc-IgG, RZA-IgG und GPA-IgG bewirkt keine Veränderung in der Freisetzung von CCL18
  - 3.2.1 Die CCL18-Sekretion von mit IgG stimulierten THP-1 Zellen korreliert mit dem Alter der Spender
- 3.3 Zytokinfreisetzung von THP-1 Zellen nach Stimulierung mit HC-IgG, SSc-IgG oder RZA-IgG
  - 3.3.1 Die Hauptkomponentenanalyse der Zytokinfreisetzung von THP1-Zellen nach Stimulierung mit HC-IgG, SSc-IgG oder RZA-IgG zeigt kein Clustering
  - 3.3.2 Die Stimulierung von THP-1 Zellen mit HC-IgG, SSc-IgG und RZA-IgG bewirkt Unterschiede in der Freisetzung einzelner Zytokine
  - 3.3.3 Die Hauptkomponentenanalyse der Zytokinfreisetzung von THP-1 Zellen ergibt nach kombinierter Analyse von gemessenen und publizierten Daten ebenfalls kein Clustering
  - 3.3.4 Validierung der Zytokinfreisetzung von THP-1 Zellen mit verdoppelter Anzahl an SSc-IgG Messwerten ergibt ähnliche und unterschiedliche Muster
- 3.4 Zirkulierende IgG von Gesunden und SSc Patienten enthalten ADRB1- und ADRB2-Antikörper

- 3.4.1 Positive Korrelation der ADRB2-Antikörperwerte zwischen Serum und IgG bei der SSc
- 3.5 Die Ko-Stimulierung geprimter PBMC mit SSc-IgG, welches eine hohe ADRB2-Antikörpermenge enthält, führt zu gesteigerter TNF- $\alpha$  Sekretion
  - 3.5.1 Die Stimulierung von PBMC gesunder Spender mit LPS (Priming) bewirkt die Sekretion von TNF- $\alpha$
  - 3.5.2 Statistische Verfahren zur Anpassung intra- und interexperimenteller Unterschiede im PBMC-Stimulierungsversuch
  - 3.5.3 Die Ko-Stimulierung von geprimten PBMC mit SSc-IgG ADRB2 ab<sup>high</sup> führt im Vergleich mit HC-IgG zur erhöhten Freisetzung von TNF- $\alpha$
  - 3.5.4 Die TNF- $\alpha$  Sekretion von mit IgG stimulierten PBMC korreliert positiv mit der ADRB2-Antikörperkonzentration im Serum
- 3.6 Möglicher Unterschied in der Freisetzung von IL-10 nach Ko-Stimulierung geprimter PBMC mit SSc-IgG ADRB2 ab<sup>high</sup>

## 4 Diskussion

- 4.1 Limitationen durch verschiedene Datensätze, unterschiedliche Kontrollen (für die Zytokinsekretion von mit IgG stimulierten THP-1 Zellen) und verwendete Zellmodelle
- 4.2 Zytokinsekretionsmuster von THP-1 Zellen nach Stimulierung mit SSc-IgG, RZA-IgG und HC-IgG weisen Unterschiede und Ähnlichkeiten auf
  - 4.2.1 Erhöhte Sekretion von MIF und verminderte Sekretion von IGFBP4 nach Stimulierung von THP-1 Zellen mit SSc-IgG im Vergleich zu HC-IgG
  - 4.2.2 Die Mehrzahl der nach Stimulierung von THP-1 Zellen mit SSc- und RZA-IgG im Vergleich zu IVIG erhöhten Mediatoren

gehören dem Signalweg ‚durch Chemokin- und Zytokinsignalwege vermittelte Entzündung‘ an

4.3 Erhöhte Spiegel an zirkulierenden anti-ADRB2 IgG begünstigen die proinflammatorische Zytokinantwort humaner Immunzellen

## **5 Zusammenfassung**

## **6 Literaturverzeichnis**

## **7 Anhang**

7.1 Abbildungsverzeichnis

7.2 Tabellenverzeichnis

7.3 Veröffentlichungen

7.4 Weiterführende Abbildungen

7.5 Ethikvotum

7.6 Danksagung

## Abkürzungsverzeichnis

ab	Antikörper (antibodies)
Abb.	Abbildung
ACR	Amerikanisches Kolleg der Rheumatologie (American College of Rheumatology)
ADRB1	$\beta$ 1-Adrenorezeptor
ADRB2	$\beta$ 2-Adrenorezeptor
ANA	Antinukleäre Antikörper
ANCA	Anti-neutrophile zytoplasmatische Antikörper (Anti-neutrophil cytoplasmatic antibodies)
ANG	Angiogenin
ATR	Angiotensinrezeptor
AT1R	Angiotensin II Rezeptor Typ 1
AT2R	Angiotensin II Rezeptor Typ 2
BDNF	Vom Gehirn stammender neurotropher Faktor (Brain-derived neurotrophic factor)
BVAS	Birmingham Vaskulitis Aktivitätsscore (Birmingham Vasculitis Activity Score)
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat (Cyclic adenosine monophosphate)
c-ANCA	zytoplasmatische ANCA (cytoplasmatic ANCA)
CCL	Chemokin (C-C Motiv) Ligand
CCR	Chemokin (C-C Motiv) Rezeptor
CD74	Cluster der Differenzierung 74 (Cluster of Differentiation 74)
CFS	Chronisches Fatigue Syndrom
CSF	Kolonie-stimulierender Faktor (Colony stimulating factor)

CXCL	CXC-Motiv-Chemokin Ligand
CXCR	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor
DLCO	Diffusionskapazität der Lunge für Kohlenmonoxid (Diffusion capacity of the lung for carbon monoxide)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dSSc	Diffus cutane Systemische Sklerose
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Ethylenediaminetetraacetic acid)
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (Epidermal growth factor)
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (Epidermal growth factor receptor)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Erk	Extrazellulär Signal-gesteuerte Kinase (Extracellular-signal regulated kinase), Synonym: MAPK
ET	Endothelin
ETAR	Endothelin Typ A Rezeptor
ETBR	Endothelin Typ B Rezeptor
ETR	Endothelinrezeptor
EU	Endotoxineinheiten (Endotoxin Units)
EULAR	Europäische Liga gegen Rheumatismus (European League against Rheumatism)
EUSTAR	Europäische Sklerodermie Studien- und Forschungsgruppe (European Scleroderma Trials and Research Group)
FBS	Fetales Kälberserum (Fetal bovine serum)
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor (Fibroblast growth factor)
FPLC	Fast protein liquid chromatography
FVC	Forcierte Vitalkapazität (Forced vital capacity)

GDP	Guanosindiphosphat
geprimt	LPS-vorstimuliert
GI	Gastrointestinal
Gi	inhibitorisches G-Protein
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (Granulocyte macrophage colony stimulating factor)
GPA	Granulomatose mit Polyangiitis
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptor Kinase
GRO	Wachstumsreguliertes Protein (Growth-regulated protein)
GTP	Guanosintriphosphat
HC	Gesunde Kontrolle (Healthy control)
HMEC-1	Humane mikrovaskuläre Endothelzellen (Human microvascular endothelial cells)
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IgA	Immunglobulin A
IGFBP	Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-bindendes Protein (Insulin like growth factor binding protein)
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
ILD	Interstitielle Lungenerkrankung (Interstitial lung disease)
IVIG	Intravenöse Immunglobuline
JAK	Januskinase
KGF	Keratinocyten Wachstumsfaktor (Keratinocyte growth factor), Synonym: FGF7
KL-6	Pneumoprotein Krebs von den Lungen 6

limma	Lineares Modell für Mikroarray-Daten (Linear Model for Microarray Data)
LPS	Lipopolysaccharid
ISSc	Limitiert cutane Systemische Sklerose
M	Muskarinrezeptor
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase, Synonym: Erk
MAPKK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase
MAPKKK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase-Kinase
Matching	Anpassung
MCP	Monozyten Chemoattraktorprotein (Monocyte chemoattractant protein)
M-CSF	Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (Macrophage colony stimulating factor), Synonym: CSF1
ME	Myalgische Enzephalomyelitis
MEK	Mitogen-aktivierte Erk Kinase
MIF	Makrophagen-Migrationshemmungsfaktor (Macrophage migration inhibitory factor)
MIP-1	Makrophagen-Entzündungsprotein 1 (Macrophage inflammatory protein 1)
mRSS	Modifizierter Rodnan Haut Score (Modified Rodnan skin score)
MW	Mittelwert (Arithmetisches Mittel)
NF- $\kappa$ B	Nukleärer Faktor $\kappa$ B
nparLD	Nicht-parametrische Methode zur Analyse longitudinaler Daten in faktoriellem Kontext
NTF	Neurotrophin
PAH	Pulmonal-arterielle Hypertonie

PAR-1	Protease-aktivierter Rezeptor 1
PARC	Pulmonales aktivierungsreguliertes Chemokin (Pulmonary activation-regulated chemokine)
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen (Peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline)
PCA	Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis)
PDGF	Thrombozyten-abgeleiteter Wachstumsfaktor (Platelet-derived growth factor)
PDGFB	Thrombozyten-abgeleitete Wachstumsfaktor Untereinheit B (Platelet-derived growth factor subunit B)
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMR	Polymyalgia rheumatica
PPBP	Pro-Thrombozyten-Basisprotein (Pro-platelet basic protein)
Priming	Vorstimulierung mit LPS
PR3	Proteinase 3
Ras	Ratten Sarkom (Rat sarcoma)
RZA	Riesenzelleriitis
SSc	Systemische Sklerose
STAT	Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
Tbl.	Tabelle
TGF- $\beta$ / TGFB	Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$ (Transforming growth factor $\beta$ )
THP-1	Tohoku Hospital Pediatrics-1
TNF	Tumor Nekrose Faktor (TNF und TNF- $\alpha$ werden im Nachfolgenden analog zur Literatur synonym verwendet)

TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$ (TNF und TNF- $\alpha$ werden im Nachfolgenden analog zur Literatur synonym verwendet)
TNFRSF11B	TNF Rezeptor Superfamilienmitglied 11B (TNF receptor superfamily member 11B)
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1 (Vascular cell adhesion molecule 1)
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (Vascular endothelial growth factor)
VDI	Vaskulitis Schadensindex (Vasculitis Damage Index)

**Hinweis:** Zur besseren Lesbarkeit wird in dieser Arbeit das generische Maskulinum verwendet und auf eine Doppelnennung bzw. gegenderte Bezeichnungen verzichtet. Die in dieser Arbeit verwendeten Personenbezeichnungen beziehen sich, sofern nicht anders kenntlich gemacht, immer gleichermaßen auf alle Geschlechter.

# 1 Einleitung und Zielsetzung

## 1.1 Kurze klinische Charakterisierung verschiedener Autoimmunerkrankungen

### 1.1.1 Systemische Sklerose

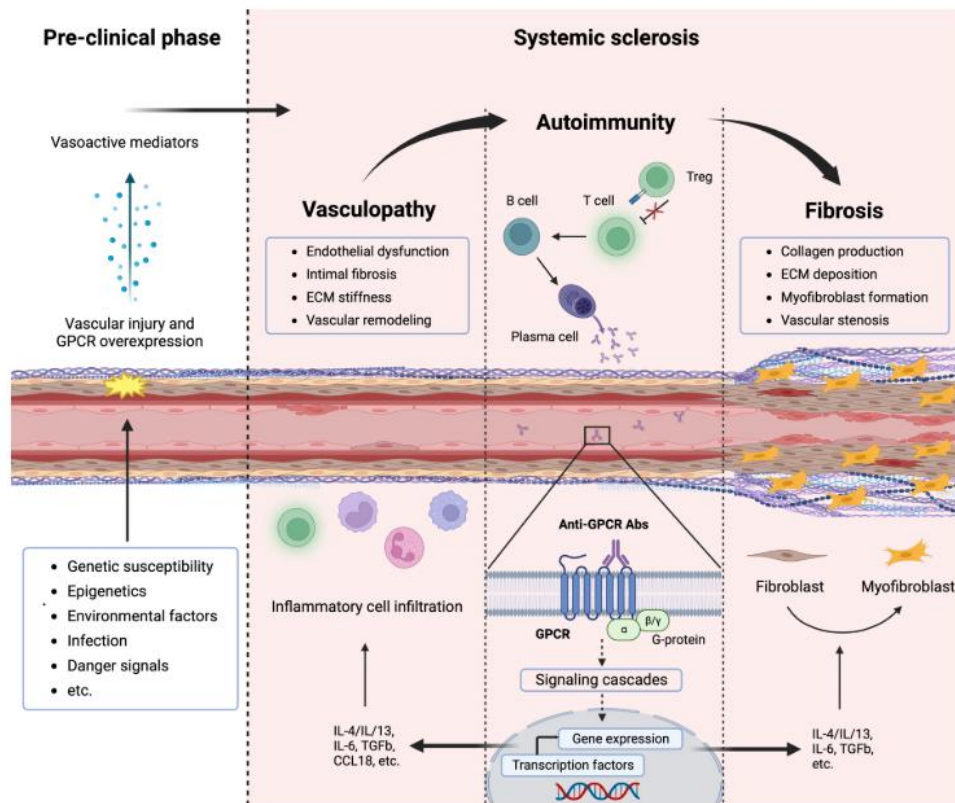
Die Systemische Sklerose (SSc) ist eine Erkrankung des Bindegewebes, die sich durch eine Kombination immunologischer Charakteristika, mikrovaskulärem Schaden und ausgeprägter Fibrose auszeichnet<sup>1-3</sup>. Sie präsentiert sich klinisch sehr heterogen und kann zu schwerer Dysfunktion fast jeden Organs führen<sup>1,3</sup>. Die am häufigsten betroffenen Organe sind die Lungen, das Herz, die Nieren und der Ösophagus<sup>1</sup>. Bei fast allen SSc-Patienten finden sich Autoantikörper, die sich v.a. gegen intrazelluläre, d.h. nukleäre und nukleoläre Strukturen richten<sup>2</sup>. Diese diagnostisch relevanten antinukleären Autoantikörper richten sich gegen DNA Topoisomerase I, RNA Polymerase III, Fibrillarin, Zentromer-Proteine oder Th/To Ribonucleoprotein und treten gemeinsam mit klinischen Manifestationen auf (z.B. anti-DNA Topoisomerase I mit interstitieller Lungenerkrankung (ILD))<sup>2</sup>. Es können zwei Formen der SSc unterschieden werden, die diffus cutane SSc (dSSc) und die limitiert cutane SSc (lSSc)<sup>4</sup>. Die dSSc zeichnet sich durch Hautbeteiligung an Rumpf und Akren, eine frühe und häufige Beteiligung der Organe und ein erst kurz vor letzterer auftretendes Raynaud-Syndrom aus<sup>4</sup> und geht charakteristischerweise mit anti-Topoisomerase I- und anti-RNA Polymerase III Antikörpern einher<sup>2</sup>. Die lSSc ist durch eine auf Gesicht oder distale Akren beschränkte oder ganz fehlende Hautbeteiligung, langes Vorhandensein des Raynaud-Syndroms mit weniger stark ausgeprägter Organbeteiligung sowie häufiges Vorhandensein von anti-Zentromer-Antikörpern gekennzeichnet<sup>4</sup>. Antinukleäre Autoantikörper von SSc-Patienten sind auch mit dem zirkulierenden Zytokinprofil assoziiert<sup>5</sup>. Im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöhte IL-8 Plasmaspiegel finden sich beispielsweise bei Topoisomerase-Antikörper-positiven Patienten; IL-10 sowie IFN $\gamma$  sind im Plasma von SSc Patienten mit Topoisomerase- und Zentromer-Antikörpern erhöht nachweisbar, aber nicht bei Patienten mit RNA Polymerase III-Antikörpern<sup>5</sup>.

### **1.1.1.1 Epidemiologie**

Die SSc tritt mit geographischen Unterschieden bezogen auf Prävalenz und Inzidenz auf (Nordamerika > Europa > Asien)<sup>6,7</sup>. In Europa erfolgt Studien zufolge die Diagnose der SSc meist in einem Alter zwischen 33,5 und 59,8 Jahren<sup>6</sup>.

### **1.1.1.2 Ätiologie und Pathogenese**

Zahlreiche Faktoren können als Risikofaktoren für die SSc gewertet werden, wobei eine eindeutige Ursache für die Entstehung der Erkrankung nicht bekannt ist. Hierzu zählen u.a. Geschlecht, Alter, ethnische Herkunft, genetische Prädisposition und Familiengeschichte<sup>7</sup>. Das weibliche Geschlecht ist häufiger von der SSc betroffen als das männliche Geschlecht<sup>6-8</sup>. Es wird davon ausgegangen, dass Umweltfaktoren in der Entstehung des SSc eine Rolle spielen<sup>2</sup>. Die Pathogenese der SSc ist nicht vollständig bekannt und umfasst viele Aspekte. Beispielsweise bewirkt die Stimulierung mit SSc-IgG eine Veränderung des Sekretoms der Zellen hin zu einem eher proinflammatorischen und profibrotischen Phänotyp, was darauf hindeutet, dass das für die SSc charakteristische proinflammatorische und profibrotische Milieu im Gewebe durch Generierung des entsprechenden Phänotyps in Monozyten, auf SSc-IgG zurückzuführen ist<sup>9</sup>. Hier werden in diesem Kontext vorrangig Autoantikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) betrachtet, welche bei Patienten mit verschiedenen chronisch-entzündlichen Erkrankungen, wie beispielsweise der SSc, im Vergleich zu Gesunden verändert auftreten<sup>10</sup> (s. auch Abschnitt 1.2). Die Mitwirkung der GPCR an der Pathogenese der SSc ist in der folgenden Abbildung von Akbarzadeh et al.<sup>11</sup> dargestellt.



**Abb. 1: Pathogenese der SSc.** Die SSc wird durch ein Zusammenspiel von Vasculopathie, Autoimmunität und Fibrose charakterisiert. Im frühen Verlauf der Erkrankung kommt es zu einer mikrovaskulären Schädigung, was eine Dysregulation des Immunsystems im Sinne einer Autoimmunität begünstigt. Es kommt zur Bildung von Autoantikörpern, u.a. gegen GPCR. Über die Aktivierung der folgenden Signalkaskaden werden Mediatoren freigesetzt und die Entzündungsreaktion verstärkt. In der Folge entstehen sowohl Vasculopathie als auch Fibrose, was zu einer fortschreitenden Verengung der Gefäße führt.

Abbildung nach Akbarzadeh et al., 'When natural antibodies become pathogenic: autoantibodies targeted against G protein-coupled receptors in the pathogenesis of systemic sclerosis' (2023).

### 1.1.1.3 Therapie und Prognose

Eine kausale Behandlung der SSc gibt es zurzeit nicht. Eine frühzeitige symptomatische Behandlung ist daher essentiell, um das Fortschreiten der Organmanifestationen aufzuhalten und somit die Prognose für die Patienten zu verbessern<sup>12</sup>. Zusätzlich zur symptomatischen Therapie ist die generelle Immunsuppression eine Therapieoption<sup>2</sup>. Im Vergleich zu früheren Berichten hat sich das Überleben von Patienten mit SSc verbessert<sup>7</sup>. Das männliche Geschlecht und ein späteres Auftreten der ersten Krankheitssymptome zählen zu den Faktoren, die die Überlebensrate negativ beeinflussen<sup>7</sup>. Weiterhin zählen hierzu das Vorliegen

von anti-Topoisomerase- und anti-U1-Antikörpern, sowie das Auftreten bestimmter klinischer Manifestationen der SSc, wie beispielsweise der pulmonalen Fibrose oder der pulmonal arteriellen Hypertonie<sup>7</sup>. Krebserkrankungen treten bei Vorliegen einer SSc gehäuft auf und tragen ebenfalls zur negativen Beeinflussung der Überlebensrate bei, Angaben zur Art und Häufigkeit variieren jedoch in der Literatur<sup>7</sup>.

### **1.1.2 Riesenzellerteriitis**

Die Riesenzellerteriitis (RZA) zählt zu den Vaskulitiden, betrifft im Allgemeinen supraaortale Gefäße<sup>13</sup> sowie die Aorta und ihre Abgänge und ist somit eine Erkrankung der großen Gefäße<sup>14</sup>. Die Erkrankung betrifft mehr Frauen als Männer (2-3:1) und tritt vor allem bei älteren Patienten (50 Jahre und älter) auf<sup>14</sup>. Die Inzidenz der RZA liegt bei 10-20 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und pro Jahr<sup>14</sup>. Die häufigste Folge der Erkrankung sind Durchblutungsstörungen, die mit Symptomen wie Kopfschmerzen, Druckschmerz der Kopfhaut und Sehstörungen verbunden sein können<sup>14</sup>. Zudem können Fatigue, subfebrile Temperaturen und Gewichtsverlust sowie im Verlauf der Erkrankung beispielsweise thromboembolische Ereignisse oder Gefäßstenosen auftreten<sup>14</sup>. Eine gefürchtete Komplikation ist der irreversible Sehverlust durch eine anteriore ischämische Optikusneuropathie<sup>13</sup>. Während die Pathogenese der RZA nicht vollständig bekannt ist, konnten unter anderem Zytokine bzw. Mediatoren ausgemacht werden, die hierzu beitragen (IL-1, IL-6, IL-12, IL-23, TNF, VEGF, PDGF, ET-1) und teilweise als Ansatz für die Therapie der Erkrankung verwendet werden (z.B. Tocilizumab gegen IL-6)<sup>13</sup>. Die RZA kann überlappend mit der Polymyalgia rheumatica (PMR) auftreten, die durch Schmerzen und Steifigkeit im Bereich von Hals, Schultern und Hüfte gekennzeichnet ist<sup>13</sup>.

### **1.1.3 Granulomatose mit Polyangiitis**

Wie die RZA zählt die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) ebenfalls zu den Vaskulitiden, sie betrifft allerdings vor allem kleine und mittlere Gefäße<sup>14</sup>. Es kommt in benannten Gefäßen vor allem im oberen und unteren Respirationstrakt zu einer granulomatösen und nekrotisierenden Entzündung<sup>14</sup>. Die Erkrankung betrifft

Männer und Frauen gleichermaßen und manifestiert sich meist zwischen dem 45. und 60. Lebensjahr<sup>14</sup>. Die Inzidenz der GPA liegt bei 10 Neuerkrankungen pro 1.000.000 Einwohner und pro Jahr<sup>14</sup>. Die Beteiligung des HNO-Traktes kann zu blutigem und borkigem Schnupfen, sowie zu einer chronischen Sinusitis beziehungsweise einer chronischen Otitis media führen<sup>14</sup>. Im Verlauf kann die Entzündung zu einer Zerstörung des Nasenskeletts und der Nasennebenhöhlen führen, was die Entstehung der für die GPA typischen ‚Sattelnase‘ zur Folge hat<sup>14</sup>. Häufig tritt im Rahmen der GPA eine nekrotisierende Glomerulonephritis auf, neben renaler Beteiligung kann zudem auch eine Beteiligung des Nervensystems, des Herzens, der Haut oder der Augen auftreten<sup>14</sup>. Auch bei der GPA spielen Autoantikörper eine wichtige Rolle, so gehört sie zu den Anti-neutrophilen zytoplasmatischen Antikörper (ANCA)-assoziierten Vaskulitiden<sup>15</sup>. Zumeist sind die ANCA gegen die Proteinase 3 (PR3), aber auch gegen die Myeloperoxidase jeweils von Neutrophilen gerichtet<sup>15</sup>. Im Zusammenspiel mit proinflammatorischen Zytokinen (z.B. TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17A) aktivieren ANCA Neutrophile und verursachen eine mikrovaskuläre Schädigung<sup>15</sup>. Zudem reagieren ANCA mit Monozyten, die wiederum Zytokine sezernieren (z.B. IL-1 $\beta$ , TNF) und damit zur vielschichtigen Pathogenese beitragen<sup>15</sup>.

## **1.2 Ausgewählte Zytokine und ihre Rolle bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen**

### **1.2.1 CCL18 als Marker bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen**

CCL18 ist ein Chemokin<sup>16</sup>, welches auch als Pulmonary activation-regulated chemokine (PARC) bezeichnet wird und erstmals 1997 beschrieben wurde<sup>17</sup>. Als Rezeptor für CCL18 wurde der Chemokinrezeptor CCR8 identifiziert, der z.B. von TH2 Zellen exprimiert wird<sup>18</sup>. Insbesondere Monozyten und dendritische Zellen sezernieren CCL18<sup>19</sup>. Es findet sich konstitutiv in hohen Mengen im Plasma<sup>19</sup> und in der Lunge, ist aber auch in niedrigeren Mengen in Lymphknoten, Thymus und Appendix zu finden<sup>17</sup>. Darüber hinaus ist CCL18 induzierbar, die Produktion kann beispielsweise in Monozyten durch LPS gesteigert werden<sup>19</sup>. Man geht davon aus, dass CCL18 zur physiologischen Ansiedelung von Lymphozyten und dendritischen Zellen und Organisation lymphatischer Strukturen beiträgt und somit eine Rolle in der Erzeugung primärer Immunantworten spielt<sup>19</sup>. Darüber hinaus regt es die

Kollagenablagerung durch Fibroblasten an<sup>19</sup>. Im Lungengewebe wurde CCL18-mRNA in Alveolarmakrophagen festgestellt; hierbei handelt es sich um Zellen, die eine wichtige Rolle in Entzündungsprozessen spielen<sup>17</sup>. Zudem legt das Vorhandensein von CCL18-mRNA in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) nach Stimulierung mit LPS nahe, dass CCL18 an proinflammatorischen Prozessen beteiligt ist<sup>17</sup>.

Eine erhöhte CCL18 Produktion wurde bei verschiedenen Erkrankungen, darunter Tumor- sowie entzündliche Erkrankungen, nachgewiesen<sup>19</sup>. Beispielsweise in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis oder in Aszites von Patienten mit Ovarialkarzinom wurden erhöhte CCL18 Mengen nachgewiesen<sup>19</sup>. Die CCL18 Konzentration im Serum von Patienten mit SSc ist ein signifikanter Prädiktor für die Progression einer ILD und für die Mortalität der Patienten (s. auch Tbl. 1b, S. 23)<sup>20,21</sup>. Werte von >140 ng/mL CCL18 erhöhen das Risiko von SSc Patienten, innerhalb der nächsten zwei Jahre zu versterben oder eine Verschlechterung der Lungenfunktion zu erfahren<sup>20</sup>. Erhöhte CCL18-Titer werden bei der SSc mit einem erhöhten radiologischen Ausmaß an Lungenfibrose assoziiert<sup>21</sup>. Eine immunsuppressive Therapie mit Cyclophosphamid oder Mycophenolat Mofetil für ein Jahr konnte die CCL18 Konzentration im Plasma von SSc Patienten senken<sup>21</sup>. Bei Gesunden >60 Jahren finden sich im Plasma höhere CCL18-Titer als bei Gesunden <35 Jahren<sup>22</sup>.

### **1.2.2 TNF- $\alpha$ als Marker bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen**

Der Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ist ein trimeres Zytokin<sup>23</sup>, welches vor allem von Monozyten/Makrophagen, aber auch von T- und B-Zellen, natürlichen Killerzellen, Mastzellen, Fibroblasten, Neutrophilen, Osteoklasten<sup>24,25</sup>, Keratinozyten und Neuronen sezerniert wird<sup>16</sup>. Es tritt in der Akutphase der Immunantwort auf und wirkt inflammatorisch<sup>23</sup>. Ferner gehört TNF- $\alpha$  zu den wichtigsten proinflammatorischen Zytokinen<sup>16</sup>. Zudem konnte TNF- $\alpha$  mit Lipidstoffwechsel, Gerinnung, Insulinresistenz, Endothelfunktion<sup>16</sup> und sogar dem zirkadianen Rhythmus in Verbindung gebracht werden<sup>24</sup>. TNF- $\alpha$  ist im Serum von Gesunden für gewöhnlich nicht nachweisbar, kann aber unter inflammatorischen oder infektiösen Bedingungen ansteigen<sup>25</sup>. Signale, die durch die Rezeptoren der

TNF-Familie vermittelt werden, induzieren zum einen den Zelltod, zum anderen aber auch Differenzierung und Überleben der Zelle<sup>23</sup>. Hierbei ist der TNF-Rezeptor 1, welcher sich auf allen humanen Geweben befindet, sowie der TNF-Rezeptor 2, welcher vorrangig von Immunzellen, Neuronen und Endothelzellen exprimiert wird, von Bedeutung<sup>24</sup>. Unter anderem wird über diese Rezeptoren der NF- $\kappa$ B Signalweg aktiviert, der Zellüberleben, Immunzell-Proliferation und Inflammation induziert<sup>24</sup>. Beispielsweise werden Zytokinproduktion sowie Expression und Aktivierung von Adhäsionsmolekülen angeregt<sup>16</sup>.

Tumor Nekrose Faktoren spielen im Allgemeinen eine wichtige Rolle in der Homöostase, aber auch für Erkrankungen<sup>26</sup>, z. B. bei ankylosierender Spondylitis, Morbus Crohn, Psoriasis<sup>24</sup>, rheumatoider Arthritis, Morbus Behçet, Alzheimer oder Parkinson<sup>16</sup>. So wird beispielsweise bei Patienten mit rheumatoider Arthritis neben weiteren Zytokinen in entzündeten Gelenken TNF- $\alpha$  produziert<sup>25</sup>. Auch bei der ankylosierenden Spondylitis wurde in den Iliosakralgelenken TNF- $\alpha$  festgestellt<sup>25</sup>. Darüber hinaus korrelieren hier erhöhte TNF- $\alpha$  Serumspiegel mit der Krankheitsaktivität<sup>25</sup>. In der SSc ist TNF- $\alpha$  zusammen mit Lungenfunktionsparametern, jungem Alter und dem Auftreten einer neutrophilen Alveolitis ein Indikator für die Progression der Erkrankung<sup>27</sup>. Außerdem kann TNF- $\alpha$  bei Vorliegen in hoher Konzentration in der bronchoalveolären Lavage mit progressiver oder im Endstadium vorhandener interstitieller Lungenerkrankung assoziiert werden<sup>27</sup>. Darüber hinaus finden sich bei schweren Formen von GPA mit Lungenbeteiligung erhöhte TNF- $\alpha$  Serumspiegel<sup>28</sup>. Bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen, darunter rheumatoider Arthritis, werden therapeutisch TNF-Blocker eingesetzt<sup>25</sup>. Die Therapie der SSc hingegen stützt sich weitestgehend auf andere Immunsuppressiva/ Biologika<sup>29</sup>.

### **1.2.3 IL-10 als Marker bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen**

IL-10 wird hauptsächlich von Monozyten<sup>30</sup>, B-Zellen und Makrophagen<sup>16</sup>, aber auch von T-Zellen und Mastzellen sezerniert und wirkt antiinflammatorisch<sup>23</sup>. Es wirkt inhibitorisch auf die Produktion von anderen Zytokinen und auf die Funktion mononukleärer Zellen<sup>16</sup>, beispielsweise hemmt es die Th-1-vermittelte Zellantwort<sup>23</sup>. Außerdem wirkt es inhibitorisch auf den NF- $\kappa$ B Signalweg, erhöht das Überleben von B-Zellen, ihre Proliferation und die Bildung von Antikörpern<sup>30</sup>. IL-10

vermittelt Signale über einen Rezeptor-Komplex, der aus je zwei Kopien des IL-10 Rezeptors 1 und 2 besteht<sup>31</sup>. Diese werden von den meisten hämatopoetischen Zellen und darüber hinaus von einer Vielzahl weiterer Zellen exprimiert bzw. kann die Expression hochreguliert werden (bspw. auf Fibroblasten oder Epithelzellen)<sup>31</sup>. Mit Bindung von IL-10 an seinen Rezeptor wird ein Signalweg über JAK/STAT aktiviert<sup>31</sup>. Die Menge an IL-10 im Blut unterscheidet sich bei Gesunden unterschiedlichen Alters<sup>22</sup>. So zeigten sich bei Gesunden Kontrollen (HC) >60 Jahre erhöhte Mengen von IL-10 im Vergleich zu HC <35 Jahre<sup>22</sup>.

Die Plasmaspiegel von IL-10 sind bei SSc-Patienten nicht generell erhöht, es lassen sich aber bei einer Krankheitsdauer von >10 Jahren und bei Positivität für anti-Topoisomerase-Antikörper und anti-Zentromer-Antikörper erhöhte Plasmaspiegel feststellen<sup>5</sup>. Darüber hinaus konnten im Blut von Patienten mit SSc-ILD erhöhte IL-10 Spiegel festgestellt werden<sup>22</sup>. Auch bei GPA-Patienten mit Lungenbeteiligung sind die Serumspiegel von IL-10 erhöht<sup>32</sup> und die RZA geht generell mit erhöhten IL-10 Spiegeln einher<sup>33</sup>.

#### **1.2.4 Zytokinprofil und Zytokinbiomarker bei der SSc**

Zytokinprofile in Plasma bzw. Serum von Patienten mit SSc unterscheiden sich von denen Gesunder Kontrollen, was einerseits mögliche Anhaltspunkte für Therapieoptionen schafft<sup>5,34</sup> und andererseits die Möglichkeit für die Identifikation spezifischer Biomarker eröffnet<sup>35</sup>. Als Biomarker für die Diagnose der SSc-assoziierten ILD gilt beispielsweise der Serumspiegel von Surfactant Protein D, für die Schwere der SSc-assoziierten ILD der Serumspiegel des Krebs von den Lungen 6 Glykoproteins und für die Progression der SSc-assoziierten ILD der Serumspiegel von CCL18<sup>36</sup>. Darüber hinaus konnte eine Vielzahl weiterer Moleküle ausgemacht werden, die sich als potentielle Biomarker eignen (darunter Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmoleküle)<sup>37</sup>. In Tbl. 1a sind zirkulierende Zytokine und weitere Moleküle, welche sich bei der SSc im Vergleich zu gesunden Kontrollen quantitativ unterscheiden, aufgeführt. Tbl. 1b stellt ausgewählte Zytokine/andere Moleküle im Zusammenhang mit Verläufen klinischer Manifestationen in der SSc dar.

**Tbl.1a:** In der SSc im Vergleich zu HC veränderte (↑ erhöhte oder ↓ verminderte) Zytokine/ andere Moleküle. Es finden sich beispielsweise bei der SSc höhere Titer von TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN $\gamma$ <sup>5,34</sup>, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-13, MCP1, CXCL10, CXCL16, CCL13 und ET-1<sup>34</sup> sowie niedrigere Titer von IL-17, IL-23<sup>5</sup> und IL-7<sup>47</sup>. MCP1 wird auch als CCL2 bezeichnet<sup>136</sup>. In der Literatur finden sich z.T. widersprüchliche Angaben darüber, welche Zytokine in SSc-Serum bzw. Plasma erhöht/ vermindert sind. Ursächlich hierfür ist vermutlich, dass die Zytokinspiegel von einer Vielzahl von Faktoren abhängen, die möglicherweise nicht immer bekannt sind (bspw. SSc Autoantikörper<sup>5</sup>, Alter<sup>50</sup> oder Geschlecht<sup>5</sup>). Die Anzahl der in den Studien berücksichtigten SSc-Patienten wird mit n angegeben.

Zytokine/ andere Moleküle	Bei SSc im Vgl. zu HC ↑ oder ↓	Quelle
TNF- $\alpha$	↑ (n=444 bzw. 54)	5,38
IFN $\gamma$	↑ (n=444) bzw. ↓ (n=54)	5,38
IL-1 $\alpha$	↑ (n=18)	39
IL-4	↑ (n=13 bzw. 73)	40,41
IL-6	↑ (n=444 bzw. 54)	5,38
IL-8	↑ (n=78)	42
IL-10	↑ (dSSc) (n=28)	41
IL-13	↑ (n=73)	41
IL-16	↑ (n=18)	39
CXCL10	↑ (n=90)	43
CXCL16	↑ (n=89)	44
CCL2 (MCP1)	↑ (n=90)	43
CCL13	↑ (n=80)	45
ET-1	↑ (n=19)	46
IL-7	↓ (n=43)	47
IL-17	↓ (n=444)	5
IL-20	↓ (n=40)	48
IL-23	↓ (n=444)	5
MIP-1 $\alpha$	↓ (n=18)	39

**Tbl.1b:** Ausgewählte Zytokine/ andere Moleküle als Prädiktoren für Verläufe von klinischen Manifestationen in der SSc. Zusammenhänge hiermit wurden beispielsweise für CCL18, IL-6, IL-7, TGF- $\beta$  und KL-6 nachgewiesen.

Zytokine/ andere Moleküle		Quelle
CCL18	SSc-Patienten mit CCL18 Serumkonzentrationen >140 ng/mL haben ein höheres Risiko für Tod und Verschlechterung der Lungenfunktion innerhalb von 2 Jahren.	20
	Höhere CCL18 Werte im Plasma von SSc-Patienten sagen das Fortschreiten einerILD auf Grundlage von FVC und DLCO innerhalb eines Jahres voraus.	21
	Eine Serumkonzentration von CCL18 >187 ng/mL geht mit einem höheren Risiko einer späteren Verschlechterung der SSc-Lungenerkrankung einher.	49
IL-6/ IL-7	SSc-Patienten mit Serumkonzentrationen von >4.75 pg/mL (IL-6) und >2.62 pg/mL (IL-7) haben ein erhöhtes Risiko zu versterben.	35
IL-6	IL-6 Serumkonzentrationen von >16.45 pg/mL sind ein charakteristisches Merkmal für Lungenbeteiligung bei SSc-Patienten.	35
TGF- $\beta$	Höhere TGF- $\beta$ Werte (Grenzwert 360.7 pg/mL) sind mit einer Abnahme der DLCO >20% assoziiert	35
KL-6	Höhere KL-6 Werte im Plasma von SSc-Patienten sagen das Fortschreiten einerILD auf Grundlage von FVC und DLCO innerhalb eines Jahres voraus.	21

Zytokin-Titer in der Zirkulation lassen sich bei der SSc mit klinischen Manifestationen assoziieren. Patienten mit renaler Krise weisen beispielsweise vermehrt erhöhte Spiegel an TNF- $\alpha$  auf und erhöhte IL-6 Spiegel können mit ILD und pulmonaler Hypertension assoziiert werden<sup>5</sup>. Bei Patienten mit pulmonaler Hypertension treten zudem erhöhte IL-13 Spiegel auf<sup>5</sup>. IL-7 ist in der SSc ein Prädiktor sowohl für die Mortalität der Patienten als auch für den Abfall der DLCO bei Patienten mit SSc-ILD<sup>35</sup>. Eine Assoziation mit der Organbeteiligung bei der SSc konnte beispielsweise für ET-1 und MCP-1 gezeigt werden, mit der Sklerose der Haut werden IL-6, IL-10 und MCP-1 assoziiert<sup>34</sup>.

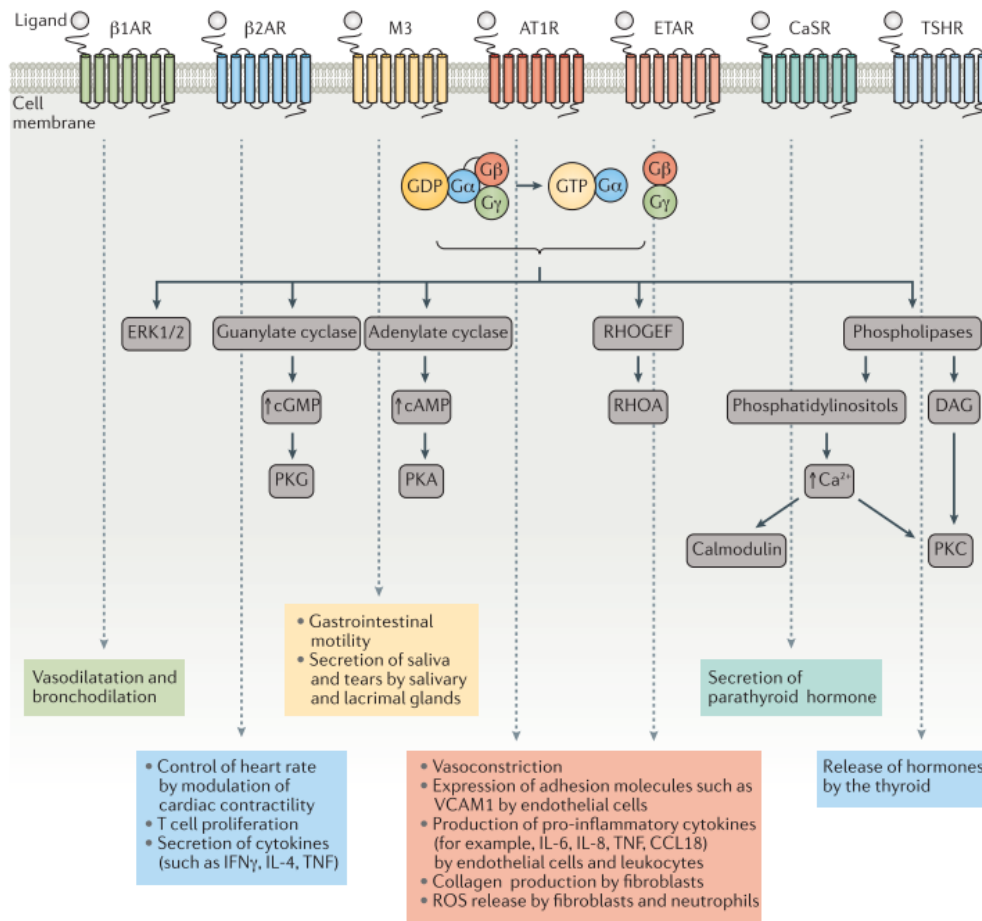
Das Plasma-Zytokinprofil von Patienten mit SSc ist abhängig von der Dauer der Erkrankung<sup>5</sup>. Bei einer Erkrankungsdauer der Patienten von bis zu 10 Jahren sind TNF- $\alpha$ - und IL-6 Spiegel gegenüber gesunden Kontrollen erhöht<sup>5</sup>. Ab einer Erkrankungsdauer von über 10 Jahren zeigt sich zwischen beiden Gruppen bezogen auf diese Zytokine kein signifikanter Unterschied mehr<sup>5</sup>. Im Allgemeinen ist die Plasmakonzentration einiger Zytokine in älteren Populationen erhöht<sup>50</sup>. Hierzu zählen IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ <sup>50</sup>. Es wird vermutet, dass dies zu einer chronischen, subklinischen Entzündung führt, die die Progression altersabhängiger Erkrankungen fördert<sup>50</sup>. Neben den bereits genannten Zytokinen werden im Alter auch IL-4 und IL-10, welche Antikörperproduktion und das Wachstum von B-Zellen steigern, vermehrt produziert<sup>23</sup>.

### **1.3 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren**

#### **1.3.1 Kurze Einführung und Charakterisierung ausgewählter G-Protein-gekoppelter Rezeptoren**

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) stellen die zahlenmäßig größte Familie an transmembranären Signalmolekülen dar<sup>51</sup>. Sie bestehen charakteristischerweise aus 7 transmembranären Domänen<sup>52</sup> und werden überall im Körper exprimiert, allerdings in unterschiedlicher Menge abhängig vom Gewebe<sup>51</sup>. Beispielsweise werden GPCR von Fibroblasten (z.B. ETAR<sup>53</sup>) und Immunzellen (z.B. ADRB2<sup>54</sup>) exprimiert. GPCR reagieren auf verschiedene endogene Liganden und können eine Vielzahl physiologischer Prozesse auslösen<sup>51</sup>. Wichtige, durch GPCR vermittelte Prozesse sind neben Homöostase, Proliferation und Migration von Zellen auch die Vermittlung des Geruchs- und Geschmackssinns sowie der visuellen

Wahrnehmung<sup>55</sup>. Bei Aktivierung eines Rezeptors durch einen Liganden wird ein G-Protein gebunden und der Austausch von GDP durch GTP initiiert, was eine Dissoziation des G-Proteins in seine Untereinheiten zur Folge hat und nachgeschaltete Signale vermittelt<sup>56</sup>. Abhängig von der Eigenschaft des an den Rezeptor gebundenen G-Proteins können in der Zelle verschiedene Signalwege ausgelöst werden<sup>52</sup> (s. Abb. 2). In Übereinstimmung mit den verschiedenen möglichen Liganden der GPCR variieren Geometrie und chemische Beschaffenheit der Ligandenbindungsstellen<sup>56</sup>. Im Allgemeinen wird durch Bindung eines Agonisten zusätzlich eine geringfügige Konformationsänderung der orthosterischen Ligandenbindungsstelle beobachtet<sup>56</sup>. GPCR weisen eine hohe Konformationsflexibilität auf und es gibt Hinweise, dass sie in Zuständen zwischen der vollständigen aktiven bzw. inaktiven Konformation vorliegen<sup>56</sup>. GPCR sind an verschiedenen Erkrankungen wie Krebserkrankungen, Infektionserkrankungen, entzündlichen Erkrankungen und Erkrankungen des kardiovaskulären Systems beteiligt<sup>55</sup>. Dies legt eine hohe klinische Relevanz von Medikamenten, die auf GPCR wirken, wie monoklonale GPCR-Antikörper, nahe<sup>55</sup>.



**Abb. 2: GPCR-Aktivierung und Signalwege.** GPCR sind heterotrimer, bestehen also aus 3 Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ). Nach Aktivierung der Rezeptoren durch die jeweiligen Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung, die den Austausch von GDP durch GTP an der  $\alpha$ -Untereinheit begünstigt. Dies bewirkt die Dissoziation der  $\alpha$ -Untereinheit von den zwei übrigen Untereinheiten, was zu einer Aktivierung verschiedener nachgeschalteter Signalwege führt (beispielsweise über die Extrazellulär Signal-gesteuerte Kinase (Erk), Adenyl- und Guanylylzyklasen, Phospholipasen oder Rho-GTPasen). Nachgeschaltet ergeben sich verschiedene biologische Effekte, wie die Vasodilatation und Bronchodilatation, Kontrolle der Herzfrequenz, T-Zell Proliferation, Sekretion verschiedener Zytokine sowie Expression, Freisetzung und Produktion verschiedener Moleküle, Motilität des Gastrointestinaltrakts, Sekretion von Speichel und Tränen und Freisetzung von Hormonen.

Abbildung nach Cabral-Marques und Riemekasten, 'Functional autoantibodies targeting G protein-coupled receptors in rheumatic diseases' (2017).

### **1.3.2 Autoantikörper gegen GPCR als potentielle Biomarker und/oder pathogenetische Faktoren bei verschiedenen Erkrankungen**

Gegen verschiedene GPCR, beispielsweise adrenerge oder muskarinerge, gerichtete Autoantikörper wurden mehrfach beschrieben und werden z.B. als Modulatoren der GPCR-Signalübertragung betrachtet<sup>57-59</sup>. GPCR-Antikörper finden sich sowohl bei Gesunden als auch bei verschiedenen Erkrankungen (z.B. SSc, Chronisches Fatigue Syndrom, Asthma, Hypertonus)<sup>57,59</sup>. Im Detail werden z.B. Antikörper gegen  $\alpha$ 1-Adrenorezeptoren u.a. mit Demenz, komplexem regionalem Schmerzsyndrom oder Hypertension bzw. Antikörper gegen M1-Rezeptoren mit Schizophrenie oder chronischem Fatigue Syndrom in Verbindung gebracht<sup>57</sup>. In jüngsten Studien wurde die Bedeutung von Antikörpern gegen den Angiotensin II Rezeptor Typ 1 (AT1R) als Biomarker für schwere Verläufe von SARS-CoV2-Erkrankungen festgestellt<sup>60</sup>. Bei Gesunden ergeben sich abhängig von Geschlecht und Alter unterschiedliche Signaturen von GPCR-Antikörpern, die sich bei verschiedenen Erkrankungen verändern<sup>61</sup>. Das Vorkommen der GPCR-Antikörper nicht nur bei Autoimmunerkrankungen unterstützt die Annahme, dass ein physiologisches Netzwerk von anti-GPCR IgG-Autoantikörpern als Teil des Immunsystems auftritt<sup>61</sup>. Antikörper gegen GPCR können als allosterische Regulatoren der GPCR betrachtet werden, die die Wirksamkeit orthosterischer Agonisten verändern können<sup>57</sup>. So wird die Angiotensin II-induzierte monozytäre Freisetzung von CCL18 durch Zugabe eines monoklonalen AT1R-Antikörpers erhöht, was die agonistische Aktivierung des AT1R nahelegt<sup>62</sup>. Man könnte auch annehmen, dass GPCR-Antikörper im Rahmen einer (Auto-) Immunantwort entstehen, die vermutlich eine Fehl- oder Überexpression von GPCR bzw. deren chronische Aktivierung widerspiegelt<sup>63</sup>.

Evidenz für die Relevanz von IgG bzw. GPCR-Autoantikörpern bei verschiedenen Erkrankungen ergibt sich aus verschiedenen Studien. Ratios der Titer von Autoantikörpern und Gesamt-IgG ( $\alpha$ 1 und 2,  $\beta$ 1, 2 und 3 adrenerge Rezeptoren, M3 und 4, AT1R, ETAR und ETBR) korrelieren bei ME/CFS mit infektgetriggertem Beginn mit der Schwere der Fatigue (alle r zwischen 0.2 und 0.4;  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2, M4, AT1R, ETAR:  $p < 0.01$ ;  $\beta$ 3, M3, ETBR:  $p < 0.05$ ) und mit Muskelschmerz (mit Ausnahme des  $\beta$ 3 adrenergen Rezeptors;  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2, AT1R, ETAR: r zwischen 0.4 und 0.6;  $\beta$ 1,  $\beta$ 2, M3, M4, ETBR: r zwischen 0.2 und 0.4;  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2, M3, M4, AT1R, ETAR:  $p < 0.01$ , ETBR:  $p < 0.05$ ), was eine Beteiligung der Autoantikörper am

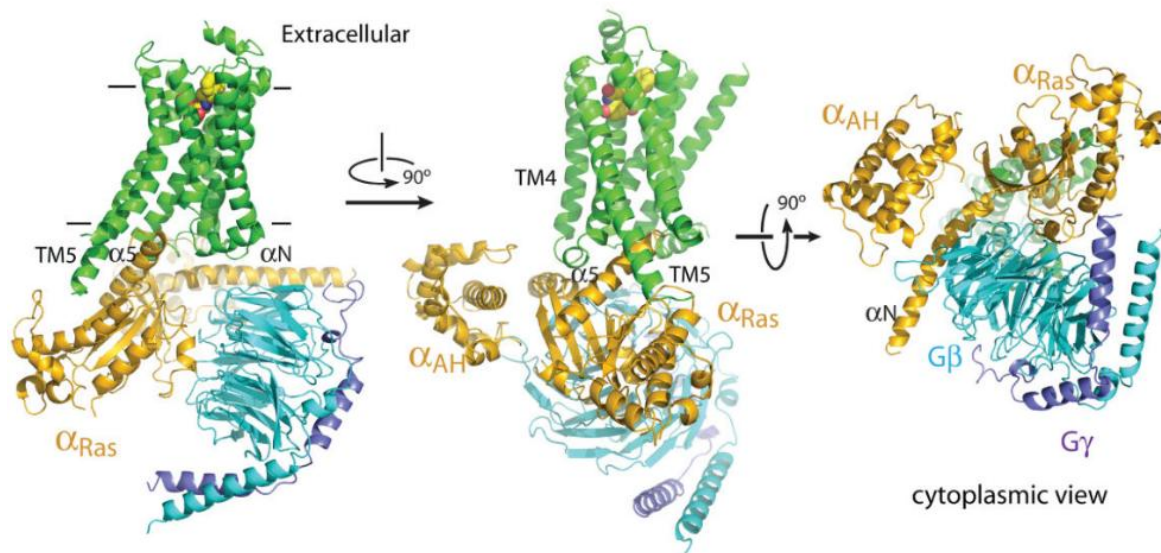
Pathomechanismus der Erkrankung nahelegt<sup>64</sup>. Erhöhte Mengen von Autoantikörpern gegen den CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 3 (CXCR3), welche in einer Population ohne Autoimmunerkrankungen nachweisbar sind, erhöhen das Risiko für Gesamtmortalität, Herztod, Herzversagen und schwere kardiale Ereignisse<sup>65</sup>. Autoantikörper gegen den AT1R und den Endothelin Typ A Rezeptor (ETAR) finden sich in IgG von SSc Patienten<sup>58,66–69</sup>. Hohe Titer dieser beiden Autoantikörper sind mit pulmonal arteriellem Hypertonus<sup>58,69</sup> und weiteren schweren Krankheitsmanifestationen sowie SSc-bedingter Sterblichkeit assoziiert<sup>58</sup>. *In vivo* wurde das Konzept der Beteiligung von B-Zellen bzw. Antikörpern an der Pathogenese untermauert<sup>70</sup>. Hierbei führte der Transfer von PBMC in ein Mausmodell zu einem Auftreten von Autoantikörpern (AT1R-ab sowie teilweise Auftreten von antinukleären Antikörpern (ANA)) und Zeichen systemischer Inflammation (inflammatorische Infiltrate in Lungen, Nieren und Muskelgewebe)<sup>70</sup>. Diese Effekte sowie ein Versterben der Mäuse wurden nicht beobachtet, wenn T- oder B-Zell depletierte PBMC zur Induktion des SSc-Mausmodells verwendet wurden<sup>71</sup>. PBMC von SSc-Patienten, die zuvor mit Rituximab behandelt worden waren, riefen diese Effekte ebenfalls nicht hervor<sup>70</sup>. Durch die PBMC verschiedener Patienten zeigten sich auch im Mausmodell verschiedene Muster der Inflammation, was die Heterogenität der Erkrankung widerspiegelt<sup>70</sup>. Darüber hinaus wurde *in vivo* eine pathologische Wirkung speziell von AT1R-Antikörpern nachgewiesen. So zeigten sich bei lokaler Injektion eines monoklonalen anti-AT1R-Antikörpers im Mausmodell zelluläre Infiltrate in der Haut (v.a. Neutrophile) und im perivaskulären Lungengewebe (v.a. T-Zellen)<sup>62</sup>. Dies legt eine Bedeutung der AT1R- und ETAR-Antikörper in der Pathogenese der SSc nahe<sup>58,66–69</sup>, bzw. bietet die Möglichkeit, diese Antikörper als prädiktive/prognostische Biomarker einzusetzen<sup>58,69</sup>.

Für die SSc sind neben den Antikörpern gegen den AT1R und den ETAR bislang Antikörper gegen den Muskarinrezeptor (M) 2, CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4)<sup>57</sup>, CXCR3, Protease-aktivierten Rezeptor 1 (PAR-1) und M3<sup>11</sup> als relevant beschrieben worden. Während man bei den Autoantikörpern gegen AT1R, ETAR, CXCR3 und PAR-1 von einer agonistischen Wirkung ausgeht, vermutet man im Falle von M3 antagonistische Effekte<sup>11</sup>. Die Pathogenese der SSc wird von den veränderten Titern, Kreuzreaktivitäten sowie synergistischen Effekten dieser Autoantikörper beeinflusst<sup>11</sup>. Bezüglich der Autoantikörper gegen den M3 wird eine Beteiligung an der Entstehung der gastrointestinalen Motilitätsstörung bei der SSc

diskutiert<sup>11</sup>. GPCR bzw. Autoantikörper gegen sie sind vielversprechende Ziele für zukünftige Therapien der SSc. Endothelinrezeptor-Blocker werden bereits in der Behandlung klinischer Komplikationen der SSc (bspw. digitale Ulcerationen) eingesetzt<sup>11</sup>. Auch für die RZA wurde eine Relevanz von Autoantikörpern gegen den ETAR festgestellt<sup>72</sup>. Frühe ischämische Ereignisse konnten hier mit niedrigen Mengen an Autoantikörpern gegen den ETAR in Verbindung gebracht werden<sup>72</sup>. Kürzlich wurde darüber hinaus ein Zusammenhang zwischen niedrigen Spiegeln an C5aR-Antikörpern und der Krankheitsaktivität sowie dem Rückfallrisiko bei ANCA-assoziierten Vaskulitiden festgestellt<sup>73</sup>.

### **1.3.3 Autoantikörper gegen den $\beta$ 1- und $\beta$ 2-Adrenorezeptor bei verschiedenen Krankheitsmanifestationen**

Signalwege, die über adrenerge GPCR vermittelt werden, spielen bei vielen physiologischen Prozessen, wie beispielsweise der Regulation des Blutdrucks oder der Körpertemperatur, eine Rolle<sup>54</sup>. Der  $\beta$ 2-Adrenorezeptor (ADRB2) wird u.a. von Zellen des angeborenen sowie des adaptiven Immunsystems exprimiert, was eine Kontrolle des Immunsystems durch das adrenerge System ermöglicht<sup>54</sup>. Natürliche Liganden des ADRB2 sind Adrenalin, Noradrenalin<sup>74</sup> und Zink, wobei letzteres als allosterischer Modulator wirkt<sup>75</sup>. Noradrenalin reduziert beispielsweise die von LPS hervorgerufene Sekretion von TNF- $\alpha$  durch Zellen des angeborenen Immunsystems und induziert die Expression des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 durch diese Zellen, was somit einen immunsuppressiven Faktor darstellt<sup>54</sup>. Verschiedene monoklonale IgG gegen  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren inhibieren die Bindung adrenerger Liganden<sup>76</sup>. Für den monoklonalen ADRB-Antikörper F-104 wurde gezeigt, dass er mit einer Determinante konkurriert, die sich nur in der Ligandenbindungsstelle  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren befindet<sup>76</sup>. Abb. 3 zeigt die Struktur des biologischen Komplexes aus ADRB2 und G-Protein in seiner Lage an der Zellmembran aus verschiedenen Blickwinkeln (von extrazellulär und aus dem Zytoplasma betrachtet)<sup>77</sup>.



**Abb.3.: Struktur des biologischen Komplexes aus ADRB2 und G-Protein:** ADRB2 (grün) mit gebundenem Agonisten (gelbe Kugeln) und trimerem G-Protein (Untereinheiten Gas in gelb, Gβ in hellblau und Gγ in dunkelblau). Zusätzlich sind verschiedene relevante Domänen des Gαs (αRas, αAH, α5, αN) sowie die TM4 und -5 Domäne des ADRB2 dargestellt. Der Komplex wird aus extrazellulärer und zytoplasmatischer Sicht betrachtet.

Abbildung nach Rasmussen et al., 'Crystal Structure of the β2 Adrenergic Receptor-Gs protein complex' (2012).

Bei dem ADRB2 handelt es sich um einen GPCR, der in Immunzellen über die Erhöhung des intrazellulären zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und die darauf folgende Aktivierung der Proteinkinase A die Transkription von Genen oder die Aktivierung bestimmter Ionenkanäle vermittelt<sup>78</sup>. Das Signal unterdrückt, wie oben beschrieben, myeloisch und T-Lymphozyten vermittelte Inflammation und kann durch den Abbau des cAMP durch Phosphodiesterasen beendet werden<sup>78</sup>. Bei hohen Noradrenalinkonzentrationen oder hoher Aktivität des Sympathikus kann eine Desensibilisierung und Herunterregulation des ADRB2 beobachtet werden, welche von den G-Protein-gekoppelten Rezeptor Kinasen (GRK) 1 und 2 sowie β-Arrestin mediiert wird und eine wichtige Rolle in der Einhaltung der normalen Zell- und Gewebefunktion spielt<sup>78</sup>. Bei chronisch erhöhter Aktivität des sympathischen Nervensystems durch eine langanhaltende Inflammation oder eine chronische zelluläre Immunantwort, beispielsweise im Rahmen einer Sepsis, spielt dies eine wichtige Rolle, um die Homöostase wiederherzustellen<sup>78</sup>. Die chronische Inflammation ist auf Grund der Freisetzung von Autoantigenen aus beschädigtem Gewebe ein Risikofaktor für die Entstehung von Autoimmunität<sup>78</sup>. Es wurde

wiederholt und für verschiedene Zelltypen gezeigt, dass der ADRB2 einen G Protein-unabhängigen, aber GRK5 oder 6 und  $\beta$ -Arrestin 2-abhängigen Signalweg nutzen kann, wenn eine hohe physiologische oder chronische Rezeptorstimulation vorliegt<sup>78</sup>. In nicht-Immunzellen (z.B. kardialen Myozyten und Endothelzellen) und in Zellkulturlinien wurde beobachtet, dass der ADRB2 auch MAPK- bzw. Erk-Signalwege aktivieren kann<sup>78</sup>. In diesem Kontext wurde ein Wechsel des gekoppelten G-Proteins von einem stimulatorischen zu einem inhibitorischen G-Protein durch die Protein Kinase A beschrieben, was eine Erk Aktivierung zur Folge hat<sup>79</sup>. Die Phosphorylierung des ADRB2 durch die GRK5, -6 oder Protein Kinase A führt in vielen Zelltypen zu Verschiebungen in den MAPK-Signalwegen, was einen Gegenspieler zum cAMP darstellt, da in diesem Fall aufgrund der alternativen Signalwege eine Förderung von Inflammation und zellulärer Immunität zu erwarten ist<sup>78</sup>. Eine Signalisierung über den ADRB2 in Makrophagen und T-Helferzellen, sowie die Expression von GRK5 und -6 auf Immunzellen wurden bereits nachgewiesen<sup>78</sup>. Hohe Konzentrationen an ADRB2 Agonisten können also kontextabhängig entweder zur Internalisierung des Rezeptors oder zur Veränderung des Signalweges führen<sup>78</sup>. Die meisten Studien berichten von einem antiinflammatorischen Effekt von ADRB2 Agonisten in Immunzellen, eine erhöhte Inflammation nach ADRB2 Stimulierung und ein Signalwegwechsel sind jedoch nicht auszuschließen<sup>78</sup>. Bei einigen rheumatologischen Erkrankungen (zum Beispiel Psoriasisarthritis oder systemischem Lupus erythematodes) konnte sowohl eine erhöhte Aktivität des Sympathikus als auch eine veränderte Aktivität des ADRB2 festgestellt werden, die sich in einer verminderten Fähigkeit, die cAMP/PKA Aktivierung zu induzieren und in einer verringerten Rezeptordichte auf Immunzellen und anderen von der Erkrankung betroffenen Zellen widerspiegelte<sup>78</sup>.

Für Autoantikörper gegen  $\beta$ -Adrenorezeptoren wurden Assoziationen mit Erkrankungsmanifestationen nachgewiesen. Bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom finden sich niedrigere Titer von Autoantikörpern gegen den  $\beta$ 1-Adrenorezeptor (ADRB1) als bei Gesunden<sup>80</sup>. Niedrige Serumtiter, insbesondere bei Patienten <60 Jahren, gehen mit einem höheren Risiko für Re-Infarkt und einer schlechteren Prognose einher<sup>81</sup>. ADRB1-Autoantikörper stehen zwar mit Prognose und Re-Infarkt-Risiko beim akuten Koronarsyndrom in Verbindung, korrelieren jedoch nicht mit gängigen kardiovaskulären Risikofaktoren, was auf eine autoimmune Komponente der Erkrankung hinweist<sup>81</sup>. Bei Patienten mit primärem

Offenwinkelglaukom und okulärer Hypertension wurden agonistische ADRB2-IgG beschrieben<sup>82</sup>. Darüber hinaus wurde eine transiente Senkung des intraokularen Drucks durch Entfernung von IgG (jedoch nicht spezifisch von ADRB2-IgG) mittels Immunadsorption erreicht<sup>82</sup>. Dies deutet gemeinsam auf einen Beitrag von Autoimmunität bzw. Autoantikörpern zur Pathogenese dieser Erkrankungen hin<sup>82</sup>. Der ADRB2 kann durch IgG bzw. Antikörper aktiviert werden<sup>83</sup>. Hierbei rufen IgG von gesunden Kontrollen einen agonistischen Effekt hervor, stimulieren also den  $\beta 2$  Adrenorezeptor, was analog zur oben beschriebenen Stimulierung des Rezeptors mit Noradrenalin zu einer Hemmung von durch LPS induziertem TNF- $\alpha$  sowie zur vermehrten Produktion von IL-10 durch Monozyten führt (LPS wurde in einer Konzentration von 2 ng/mL zugegeben und gemeinsam mit dem IgG für 18h inkubiert)<sup>83</sup>. Dieser Effekt ist bei Patienten mit ME/CFS vermindert, was auf eine mögliche Dysfunktion der ADRB2-Antikörper bei solchen Patienten hindeutet<sup>83</sup>. Hierbei zeigten sich Unterschiede zwischen Patienten mit erhöhten und normalen Serumkonzentrationen an ADRB2-Antikörpern, bei Letzteren war der Effekt weniger stark vermindert als bei Patienten mit erhöhten  $\beta 2$  Adrenorezeptor-Antikörper-Konzentrationen im Blut<sup>83</sup>. Unterschiede zwischen Patienten mit erhöhten und normalen ADRB2-Antikörper-Konzentrationen im Blut zeigten sich auch dahingehend, dass bei Patienten mit normalen Titern, ebenso wie in gesunden Kontrollen, die Rekrutierung von  $\beta$  Arrestin zum ADRB2, sowie eine ADRB2-abhängige cAMP Produktion festgestellt wurde<sup>83</sup>. Bei Patienten mit erhöhten Konzentrationen an ADRB2-Antikörpern im Blut zeigten sich diese Effekte nur sehr begrenzt oder gar nicht<sup>83</sup>. Dies spricht möglicherweise für das Vorliegen dysfunktionaler ADRB2-Antikörper bei Patienten mit ME/CFS, die zu einer Abschwächung der physiologischen ADRB2-Stimulierung durch IgG führen<sup>83</sup>.

## 1.4 Assoziationen zwischen zirkulierenden Zytokinen und anti-GPCR-Immunglobulinen bei der Systemischen Sklerose

Bisher wurde gezeigt, dass SSc-IgG, die Autoantikörper gegen den AT1R und den ETAR enthalten, *in vitro* die Sekretion von Zytokinen (IL-8, CCL18) durch humane Immunzellen (PBMC<sup>66,67</sup>) bzw. monozytäre Zelllinien (THP-1 Zellen<sup>9</sup>) sowie von humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-1<sup>68</sup>) stimulieren. Bei Monozyten, die von SSc-Patienten gewonnen wurden, fand sich im Vergleich zu Gesunden eine erhöhte AT1R/AT2R Ratio<sup>66</sup>. Veränderte Ratios der Angiotensin- und Endothelinrezeptoren (hohe AT1R/AT2R Ratio, niedrige ETAR/ETBR Ratio) korrelieren mit einer höheren CCL18-Sekretion von PBMC nach Stimulierung mit SSc-IgG, was eine Beteiligung der Angiotensin- und Endothelinrezeptoren in der Interaktion mit den entsprechenden ATR- und ETR-Antikörpern an der Aktivierung von Monozyten nahe legt<sup>66</sup>. Dies wird auch dadurch bestärkt, dass eine Blockierung von AT1R und ETAR die (anti-AT1R ab und anti-ETAR ab positive) SSc-IgG induzierte CCL18-Sekretion von PBMC signifikant reduziert<sup>67</sup>. Eine Übersicht über die SSc-IgG-induzierte Zytokinsekretion findet sich in Tbl. 2.

**Tbl.2:** Veränderte Zytokinsekretion nach *in vitro* Stimulierung verschiedener Zellen mit SSc-IgG im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

SSc-IgG induzierte Zytokinsekretion	Zelltyp	Quelle
↑ CCL18 und IL-8 Sekretion	PBMC	67
↑ IL-8 Sekretion	HMEC-1	68
↑ CCL18 Sekretion	PBMC	66
↑ CCL18 Sekretion	THP-1 Zellen	9

Außerdem wird durch Autoantikörper gegen AT1R und ETAR die Expression des vaskulären Zelladhäsionsmoleküls 1 (VCAM-1) auf mRNA Ebene in HMEC-1 gefördert und die Sekretion sowie die mRNA Expression der Zytokine IL-8 und CCL18 von HMEC-1 verstärkt, was zu einer vermehrten Rekrutierung entzündlicher Immunzellen in die Haut von SSc-Patienten führt<sup>67,68</sup>.

## 1.5 Zielsetzung

Die SSc ist eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung, die hauptsächlich durch Fibrose, Vaskulopathie und Autoimmunreaktionen gekennzeichnet ist<sup>1-3</sup>. In den vergangenen Jahren sind gegen verschiedene GPCR gerichtete IgG für die SSc als pathogenetisch bedeutsam beschrieben worden<sup>58,61,69</sup>. Man nimmt an, dass die GPCR-IgG über ein Netzwerk verknüpft sind, welches bei der SSc im Vergleich mit Gesunden Veränderungen aufweist<sup>61</sup>. Für die SSc und weitere Erkrankungen hat man herausgefunden, dass bestimmte anti-GPCR-IgG mit Krankheitsmechanismen und/oder -manifestationen assoziiert sind. Dies betrifft z.B. Antikörper gegen den AT1R, CXCR3 oder ADRB1<sup>62,65,69,80,81</sup>. Man nimmt zudem an, dass Interaktionen zwischen z.B. von Immunzellen exprimierten GPCR und dagegen gerichteten IgG durch die Modulierung der GPCR-Signalübertragung die Freisetzung von Zytokinen verändern und so zu Krankheits-Mechanismen bzw. Manifestationen beitragen<sup>66,67,83</sup>. Auf molekularer bzw. zellulärer Ebene ist gezeigt worden, dass anti-GPCR-IgG, gewonnen von SSc-Patienten, *in vitro* die Sekretion verschiedener Zytokine durch GPCR-exprimierende Immunzellen auslöst, wozu z.B. das Chemokin CCL18 gehört<sup>62,66,67</sup>. In dieser Arbeit wurde anhand von *in vitro* Experimenten die Wirkung von via Affinitätschromatographie aus Seren von SSc-Patienten gewonnenem IgG auf die Zytokinsekretion verschiedener Immunzellen ermittelt, im Vergleich mit IgG aus Seren von Patienten mit anderen chronisch-entzündlichen Autoimmunerkrankungen (GPA, RZA) und HC.

Ziel dieser Arbeit war:

1. herauszufinden, ob anhand von Zytokinen, die nach der *in vitro* Stimulierung mit SSc-IgG im Vergleich zu HC- und RZA- bzw. GPA-IgG von Monozyten-ähnlichen Zellen (THP-1) sezerniert werden, Muster und/oder Unterschiede erkannt werden können, ergänzt durch bereits bestehende Daten (<sup>9</sup>, kombinierte Ergebnisauswertung).
2. herauszufinden, ob sich die Sekretion von TNF- $\alpha$  und IL-10 durch PBMC gesunder Spender nach der *in vitro* Stimulierung mit IgG von SSc-Patienten und HC in Abhängigkeit von der Menge an anti-ADRB2-IgG unterscheidet.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### IgG Anreicherung

Name	Hersteller	Katalognummer
Di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	P030.1
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	MERCK Kommanditgesellschaft auf Aktien, Darmstadt	1.06346.0500
Glycine (for electrophoresis, minimum 99%, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> , FW 75,07, mp 240°C)	Sigma-Aldrich Chemie Holding GmbH, Taufkirchen	G8898
TRIS (Tris(hydroxymethyl)aminomethane) research grade	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	37190.02
Ethanol absolut	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen	alt: 2222-2.5L, neu: 2246.2500
DPBS w/o Calcium, w/o Magnesium, sterile filtered	PAN - Biotech GmbH, Aidenbach	P04-36500
Ampuwa Spüllösung 1000mL Plastipur	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v. d. Höhe	alt: 13QFP112, neu: B230673
HiTrap™ Protein GHP	Cytiva Sweden AB, Schweden/Uppsala	17040401

#### Bradford Assay für Protein/IgG Bestimmung

Name	Hersteller	Katalognummer
Protein Assay Standard 1, lyophilized bovine γ-globulin	Bio – Rad Laboratories Gesellschaft mit beschränkter Haftung, Feldkirchen	500-0005
DPBS w/o Calcium, w/o Magnesium, sterile filtered	PAN - Biotech GmbH, Aidenbach	P04-36500
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio – Rad Laboratories Gesellschaft mit beschränkter Haftung, Feldkirchen	500-0006

### THP-1 Zellkultur und Stimulierung

Name	Hersteller	Katalognummer
THP-1 Zellen	Leibniz-Institut DSMZ- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig	ACC 16
DPBS w/o Calcium, w/o Magnesium, sterile filtered	PAN - Biotech GmbH, Aidenbach	P04-36500
VLE RPMI 1640, very low endotoxin, ohne Glutamin, mit 2,0g/L NaHCO <sub>3</sub> , steril filtriert	Biosell GmbH & Co. KG, Ennigerloh	BS.F 1415
FBS Very Low Endotoxin < 5 EU/ml	Biosell GmbH & Co. KG, Ennigerloh	FBS.VLE.0100
Penicillin-Streptomycin Solution 100X	BIOWEST SAS, Frankreich/Nuaille	L0022
2-Mercaptoethanol 98+%	Sigma-Aldrich Chemie Holding GmbH, Taufkirchen	M-3148
HEPES PUFFERAN® CELLPURE® ≥99,5%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	HN77.4
Ethanol absolut	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen	alt: 2222-2.5L, neu: 2246.2500
Lipopolysaccharide from <i>Escherichia coli</i> O55:B5	Sigma-Aldrich Chemie Holding GmbH, Taufkirchen	L4524

### PBMC-Isolation und Stimulierung

Name	Hersteller	Katalognummer
DPBS w/o Calcium, w/o Magnesium, sterile filtered	PAN - Biotech GmbH, Aidenbach	P04-36500
BioColl® Trennlösung; Dichte 1,077g/mL, steril filtriert	Biosell GmbH & Co. KG, Ennigerloh	BS.L 6115
VLE RPMI 1640, very low endotoxin, ohne Glutamin, mit 2,0g/L NaHCO <sub>3</sub> , steril filtriert	Biosell GmbH & Co. KG, Ennigerloh	BS.F 1415
Lipopolysaccharide from <i>Escherichia coli</i> O55:B5	Sigma-Aldrich Chemie Holding GmbH, Taufkirchen	L4524

## LPS-Test

Name	Hersteller	Katalognummer
HEK Blue™ LPS Detection Kit 2	InvivoGen Europe, Frankreich/Toulouse	rep-lps2
VLE Dulbecco's MEM w 3,7g NaHCO <sub>3</sub> , w 4,5g/L D-Glucose, w stable Glutamine, w Na-Pyruvate, very low endotoxin	Biochrom GmbH, Berlin	FG1445
FBS Very Low Endotoxin < 5 EU/ml	Biosell GmbH & Co. KG, Ennigerloh	FBS.VLE.0100
Penicillin-Streptomycin Solution 100X	BIOWEST SAS, Frankreich/Nuaillé	L0022
Trypsin-EDTA Solution	Sigma-Aldrich Chemie Holding GmbH, Taufkirchen	T4049
Wasser, Endotoxin-frei	Thermo Fisher Scientific C.F. GmbH, Braunschweig	J65589
DPBS w/o Calcium, w/o Magnesium, sterile filtered	PAN - Biotech GmbH, Aidenbach	P04-36500
Quanti Blue Reagent	InvivoGen Europe, Frankreich/Toulouse	rep-qbla
Quanti Blue Buffer	InvivoGen Europe, Frankreich/Toulouse	rep-qblq
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich Chemie Holding GmbH, Taufkirchen	D2438

## ELISA

Name	Hersteller	Katalognummer
Human CCL18/PARC DuoSet ELISA	Bio-Techne GmbH, Wiesbaden	alt: P233757, neu: DY394
Schwefelsäure 95-97%	MERCK Kommanditgesellschaft auf Aktien, Darmstadt	1.00731.2500
Wash Buffer 25x Concentrate	Bio-Techne GmbH, Wiesbaden	alt: P223775, neu: WA126
Ampuwa Spüllösung 1000mL Plastipur	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v. d. Höhe	alt: 13QFP112, neu: B230673
Reagent Diluent Concentrate 2 10x	Bio-Techne GmbH, Wiesbaden	alt: P219319, neu: DY995
Color Reagent A (Stabilized Peroxide Solution)	Bio-Techne GmbH, Wiesbaden	alt: P221862, neu: DY999 (Substrat-Reagenzpaket)

Color Reagent B (Stabilized Chromogen Solution)	Bio-Techne GmbH, Wiesbaden	alt: P221865, neu: DY999 (Substrat-Reagenzpaket)
Tween®20 (USP-NF, Ph. Eur) pure, pharma grade	AppliChem GmbH, Darmstadt	Z42312
BSA Bovine Serum Albumin US Origin Fraction V, lyophilized powder	PAN - Biotech GmbH, Aidenbach	P06-1391500
DPBS w/o Calcium, w/o Magnesium, sterile filtered	PAN - Biotech GmbH, Aidenbach	P04-36500
ELISA MAX™ Standard Set Human TNF-α	BioLegend GmbH, Koblenz	430201
ELISA MAX™ Standard Set Human IL-10	BioLegend GmbH, Koblenz	430601
DuoSet ELISA Ancillary Reagent Kit 2	Bio-Techne GmbH, Wiesbaden	DY008B

### Mykoplasmentest

Name	Hersteller	Katalognummer
MycosPY® Master Mix - PCR Mycoplasmen Testkit	Biontex Laboratories GmbH, München	M020-025
Agarose SERVA Wide Range molecular biology grade	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	11406
TRIS (Tris(hydroxymethyl)aminomethane) research grade	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	37190.02
Ethylenediamine-Tetraacetic acid (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie Holding GmbH, Taufkirchen	E-9884
Essigsäure (Eisessig) 100%	MERCK Kommanditgesellschaft auf Aktien, Darmstadt	1.00056.2500
GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain	Biotium, Inc., USA/Fremont	41003

### Geräte

Name	Hersteller	Referenznummer
Allegra™-X-12R Centrifuge	Beckman Coulter Inc., USA/Miami	ALX06E37
Zentrifuge MC6	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht-Rommelsdorf	03020110
Zentrifuge Universal 320R	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen	0005626-02-00; 1406
BioPhotometer Typ 613100.012	Eppendorf SE, Hamburg	3818

IMark Microplate Reader	Bio - Rad Laboratories Gesellschaft mit beschränkter Haftung, Feldkirchen	17770
Zellkulturbank Biological Safety Cabinets	NuAire Inc., England/Plymouth	NU-425-400 E
Mikroskop CK2	Evident Europe GmbH, Hamburg	807576
Wasserbad Typ1002	LAUDA DR. R. WOBSE GMBH & Co. KG, Lauda-Königshofen	Nicht feststellbar
Brutschrank CB150	Binder GmbH, Tuttlingen	04-66921
Vakuumpumpe Vacusafe	INTEGRA Biosciences Deutschland GmbH, Konstanz	181130
Vortex GENIUS 3	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau	01.494783
Multipette® Xstream	Eppendorf SE, Hamburg	I39490B, 106986025
ÄKTA	Cytiva Europe GmbH, Freiburg im Breisgau	2315191
Ultrasonic Cleaner, Model BS-410HTD	Breitfeld & Schliekert GmbH, Karben	P:2018041040524005
PCR-Cycler	Bio - Rad Laboratories Gesellschaft mit beschränkter Haftung, Feldkirchen	Nicht feststellbar
Elektrophorese-Kammer Criterion Cell	Bio - Rad Laboratories Gesellschaft mit beschränkter Haftung, Feldkirchen	135BR0002613
Microcomputer Electrophoresis Power Supply	Consort bvba, Belgien/Turnhout	027802
Gelreader Fusion Pulse	Vilber Lourmat Sté, Frankreich/Lamirault	16200472

### Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller	Katalognummer
Biosphere® Filter Tips (0,5-20µL)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht-Rommelsdorf	70.1116.215
Biosphere® Filter Tips (2-200µL)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht-Rommelsdorf	70.760.211

Biosphere® Filter Tips (100-1000µL)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht-Rommelsdorf	70.762.211
ViscoTip® - Syringe Tips 10mL	Eppendorf SE, Hamburg	0030089502
TC-Flasche T25, Cell+	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht-Rommelsdorf	83.3910.302
TC-Flasche T75, Stand.	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht-Rommelsdorf	83.3911.002
TC-Flasche T175	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht-Rommelsdorf	83.3912.002
Serologische Pipetten 5mL	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht-Rommelsdorf	86.1253.001
Serologische Pipetten 10mL	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht-Rommelsdorf	86.1254.001
Serologische Pipetten 25mL	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht-Rommelsdorf	86.1685.001
Tissue Culture Plate 96-Well Flat Bottom Suspension Cells	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht-Rommelsdorf	83.3924.500
Cellculture microplate, 96 well, PS, f-bottom	Greiner Bio – One GmbH, Frickenhausen	655 161
48 Well Suspension Culture Plate, sterile with lid	Greiner Bio – One GmbH, Frickenhausen	677 102
Costar® Assay Plate, 96 Well, Clear, Flat Bottom, High Binding, No Lid, Polystyrene	Corning Incorporated, USA/Corning	9018
Sealing Tape SI	Thermo Fisher Scientific C.F. GmbH, Braunschweig	alt: 24519, neu: 15036
Röhre 50mL 115x28mm, PP, DNA-, DNase-, RNase-free, non- pyrogenic, non-cytotoxic	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht-Rommelsdorf	62.559.001
Röhre 15mL 120x17mm, PP, DNA-, DNase-, RNase-free, non- pyrogenic, non-cytotoxic	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht-Rommelsdorf	62.554.002
SafeSeal Reagiergefäß 2mL PP	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht-Rommelsdorf	72.695.000
Reagiergefäß 1,5mL Safe Seal	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht-Rommelsdorf	72.706

Reagiergefäß 0,5mL Protein LB	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht-Rommelsdorf	72.704.600
Regiergefäß 0,5mL SafeSeal PCR performance tested	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht-Rommelsdorf	72.704.400
Pasteurpipetten Polyethylen (PE) 3mL unsteril	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen	7691062
Spritze 10mL Injekt® Luer Solo	B. Braun SE, Melsungen	4606108V
Aspirationskanülen 2,0x30mm	B. Braun SE, Melsungen	8258813
Minisart® Syringe Filter, hydrophilic, sterile, 0,2µm	Sartorius Aktiengesellschaft, Göttingen	17823-----K
Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filters Ultracell®-10K	MERCK Kommanditgesellschaft auf Aktien, Darmstadt	UFC901024
Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filters Ultracell®-10K	MERCK Kommanditgesellschaft auf Aktien, Darmstadt	UFC801024
pH-Indikatorstäbchen	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen	2714.0001

## 2.2 Auswahl der Probanden

Die Auswahl der Probanden erfolgte soweit möglich unter Angleichung der Geschlechterverhältnisse und der Altersmediane in den verschiedenen Gruppen. Die Diagnostik der systemischen Sklerose erfolgte anhand der ACR/EULAR-Kriterien<sup>84</sup>.

In Anhang 7.5 a und b findet sich das Ethikvotum zu den experimentellen Vorhaben (Aktenzeichen 16-199 bzw. 2023-113\_4).

## 2.2.1 Klinische Charakterisierung der Probanden, von denen IgG aus Serum für den THP-1 Stimulierungsversuch angereichert wurde

### SSc

**Tbl.3a:** Klinische Charakterisierung der SSc-Probanden für den THP-1 Stimulierungsversuch. Wenn nicht anders gekennzeichnet, sind die Daten als Median und Spannweite angegeben.

Alter (Jahre)	53 (32-77)
Geschlecht (w/m)	11/2
SSc-Form	diffus cutan: n=4; limitiert cutan: n=9
Krankheitsaktivität nach EUSTAR-Score	2.92 (0-9.508); aktive Krankheit: n=8 (61.54%)
mRSS	5 (0-19)
Lungenfibrose	n=6 (46.15%)
GI-Beteiligung	n=10 (76.92%)
Herz-Beteiligung	n=2 (15.38%)
Gesamt	n=13

### HC

**Tbl.3b:** Klinische Charakterisierung der HC-Probanden für den THP-1 Stimulierungsversuch. Wenn nicht anders gekennzeichnet, sind die Daten als Median und Spannweite angegeben.

Alter (Jahre)	51.5 (31-70)
Geschlecht (w/m)	8/4
Gesamt	n=12

### GPA

**Tbl.3c:** Klinische Charakterisierung der GPA-Probanden für den THP-1 Stimulierungsversuch. Wenn nicht anders gekennzeichnet, sind die Daten als Median und Spannweite angegeben.

Alter (Jahre)	54.5 (22-63)
Geschlecht (w/m)	2/2
Krankheitsdauer (Monate)	34 (14-60)
C-ANCA/PR3-ANCA positiv	n=3 (75%)
BVAS 3.0	19 (10-27), positiv n=4 (100%)
VDI	0.5 (0-3), positiv n=2 (50%)
Gesamt	n=4

## RZA

**Tbl.3d:** Klinische Charakterisierung der RZA-Probanden für den THP-1 Stimulierungsversuch. Wenn nicht anders gekennzeichnet, sind die Daten als Median und Spannweite angegeben.

Alter (Jahre)	77 (71-85)
Geschlecht (w/m)	5/1
Krankheitsdauer (Monate)	30 (2-150)
Polymyalgia rheumatica	n=3 (50%)
BVAS 3.0	4,5 (0-14), positiv n=5 (83.33%)
VDI	0 (0-7), positiv n=2 (33.33%)
Gesamt	n=6

## 2.2.2 Klinische Charakterisierung der Probanden, von denen IgG aus Serum für den PBMC Stimulierungsversuch angereichert wurde

### SSc: ADRB2 ab Konzentration $\leq 10$ Units/mL (SSc IgG ADRB2 ab<sup>normal</sup>)

**Tbl.4a:** Klinische Charakterisierung der Probanden der Gruppe SSc IgG ADRB2 ab<sup>normal</sup> für den PBMC Stimulierungsversuch. Wenn nicht anders gekennzeichnet, sind die Daten als Median und Spannweite angegeben.

Alter (Jahre)	54 (46-63)
Geschlecht (w/m)	6/0
SSc-Form	diffus cutan: n=1; limitiert cutan: n=3; andere: n=2
Krankheitsdauer (Monate)	52.5 (1-222)
Krankheitsaktivität nach EUSTAR-Score	0.75 (0-4); aktive Krankheit: n=1 (16.67%)
mRSS	2 (0-19)
GI-Beteiligung	n=5 (83.33%)
ADRB2-ab im Serum (U/mL)	5.7 (4.3-10)
Gesamt	n=6

### SSc: ADRB2 ab Konzentration >10 Units/mL (SSc IgG ADRB2 ab<sup>high</sup>)

**Tbl.4b:** Klinische Charakterisierung der Probanden der Gruppe SSc IgG ADRB2 ab<sup>high</sup> für den PBMC Stimulierungsversuch. Wenn nicht anders gekennzeichnet, sind die Daten als Median und Spannweite angegeben.

Alter (Jahre)	36.5 (30-53)
Geschlecht (w/m)	5/1
SSc-Form	diffus cutan: n=1; limitiert cutan: n=5
Krankheitsdauer (Monate)	95 (45-406)
Krankheitsaktivität nach EUSTAR-Score	0.29 (0-2.6); aktive Krankheit: n=1 (16.67%)
mRSS	3 (0-18)
GI-Beteiligung	n=3 (50%)
ADRB2-ab im Serum (U/mL)	23.15 (14.6-50.1)
Gesamt	n=6

### HC

**Tbl.4c:** Klinische Charakterisierung der Probanden der Gruppe HC IgG für den PBMC Stimulierungsversuch. Wenn nicht anders gekennzeichnet, sind die Daten als Median und Spannweite angegeben.

Alter (Jahre)	43 (31-70)
Geschlecht (w/m)	4/2
ADRB2-ab-Konzentration im Serum (U/mL)	4.7 (2.5-7.8)
Gesamt	n=6

### 2.2.3 Klinische Charakterisierung der Probanden, von denen IgG aus Serum für den Zytokin Array angereichert wurde

#### SSc (alleinige Auswertung des neuen Arrays)

**Tbl.5a:** Klinische Charakterisierung der SSc Probanden für den Zytokin Array bezogen auf die alleinige Auswertung des neuen Arrays. Wenn nicht anders gekennzeichnet, sind die Daten als Median und Spannweite angegeben.

Alter (Jahre)	48 (32-77), MW: 52.4
Geschlecht (w/m)	5/2
SSc-Form	diffus cutan: n=4; limitiert cutan: n=3
Krankheitsdauer (Monate)	34 (5-228)
Krankheitsaktivität nach EUSTAR-Score	4 (2.92-9.508); aktive Krankheit: n=7 (100%)
mRSS	12 (2-19)
Lungenfibrose	n=6 (85.71%)
Gesamt	n=7

#### RZA

**Tbl.5b:** Klinische Charakterisierung der RZA Probanden für den Zytokin Array. Wenn nicht anders gekennzeichnet, sind die Daten als Median und Spannweite angegeben.

Alter (Jahre)	79 (66-85), MW 70.5
Geschlecht (w/m)	3/1
Krankheitsdauer (Monate)	3.5 (1-107)
Polymyalgia rheumatica	n=3 (75%)
BVAS 3.0	8 (2-14)
VDI	3 (0-7)
Gesamt	n=4

#### HC

**Tbl.5c:** Klinische Charakterisierung der HC Probanden für den Zytokin Array. Wenn nicht anders gekennzeichnet, sind die Daten als Median und Spannweite angegeben.

Alter (Jahre)	59 (35-70), MW: 48.3
Geschlecht (w/m)	7/3
Gesamt	n=10

## SSc (gemeinsame Auswertung beider Arrays)

**Tbl.5d:** Klinische Charakterisierung der SSc Probanden für den Zytokin Array bezogen auf die gemeinsame Auswertung beider Arrays. Wenn nicht anders gekennzeichnet, sind die Daten als Median und Spannweite angegeben.

Alter (Jahre)	60.5 (32-77), MW: 56.3
Geschlecht (w/m)	7/7
Krankheitsdauer (Monate)	40 (5-228)
mRSS	14 (2-32)
Lungenfibrose	n=12 (85.71%)
Gesamt	n=14

### 2.3 IgG Aufreinigung

Die Aufreinigung der IgG aus Patientenseren erfolgte mittels FPLC an der ÄKTA Start und einer Protein-G-Säule. Die Patientenseren wurden zu Beginn 1:4 mit A+B-Puffer verdünnt und bei 10.000 x g und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Mit Hilfe einer Spritze und Kanüle wurde die Probe anschließend durch einen 0.2 µm Filter in ein neues Reaktionsgefäß überführt, hierbei diente die Aufnahme mittels Kanüle zur Vermeidung des Überführens der Lipidschicht in die Probe.

Zur Vorbereitung der ÄKTA wurden alle Puffer in einem Ultraschallbad entgast. Zur Dokumentation des Aufreinigungsprozesses wurde eine Unicorn-Software verwendet. Die Schläuche der ÄKTA wurden zunächst mit Ampuwa-Wasser und anschließend mit A+B-Puffer bei einer Flussrate von 5 mL/min für je 10 Minuten gespült. Die Protein-G-Säule wurde anschließend bei einer Flussrate von 0.5 mL/min eingebaut und für 10 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min gespült. Hiernach wurde die erste Probe auf die Säule geladen. Um ein Trockenlaufen der Säule zu vermeiden, wurde mit einer Pasteurpipette so lange A+B-Puffer in das Probengefäß nachgefüllt, bis durch die UV-Messung angezeigt wurde, dass keine Probe mehr im aufgesogenen Puffer vorhanden ist. Die nun an der Säule gebunden vorliegenden IgG wurden für 20 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min mit A+B-Puffer gespült, anschließend mit Elutionspuffer eluiert und in einem frischen Reaktionsgefäß aufgefangen. Der Erfolg der Elution wurde im Unicorn-Programm anhand der UV-Messung überwacht und es wurde so lange weiter eluiert, bis der UV-Wert wieder den ursprünglichen Wert erreicht hatte. Die aufgereinigte Probe

wurde bis zu einem UV-Wert von 0 aufgefangen und direkt im Anschluss mit Hilfe von 1M Tris auf pH 6,5-7,5 gebracht. Bevor eine neue Probe wie oben beschrieben aufgeladen werden konnte, wurde noch 10 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min mit A+B-Puffer gespült. Nach Elution der letzten Probe wurde die ÄKTA wie anfangs beschrieben gespült, allerdings zunächst mit A+B-Puffer und erst nach Ausbau der Protein-G-Säule mit Ampuwa-Wasser. Die Protein-G-Säule wurde mit Hilfe einer Spritze mit Lagerungspuffer gespült und anschließend gefüllt hiermit bei 4°C gelagert. Die gewonnenen Proben wurden entweder am selben oder am darauffolgenden Tag umgepuffert. Hierzu wurden Zentrifugen-Filtereinheiten zunächst mit 2 mL PBS befüllt und bei 3.000 x g und Raumtemperatur für 10 Minuten zentrifugiert. Das PBS wurde verworfen, die Filtereinheit mit Probe aufgefüllt und erneut bei 3.000 x g und Raumtemperatur für 30 Minuten zentrifugiert. Die durchgeflossene Flüssigkeit wurde verworfen und der Prozess so lange wiederholt, bis die gesamte Probe gefiltert wurde. In der letzten Runde wurde der Rest der Probe bei Bedarf mit PBS auf das Volumen der Filtrationseinheit aufgefüllt. Anschließend wurde die im Filter vorhandene aufkonzentrierte Probe mit PBS aufgefüllt und erneut bei 3.000 x g und Raumtemperatur für 30 Minuten zentrifugiert. Die Probe wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert. Da in dem beschriebenen Verfahren nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch andere Proteine als IgG an die Protein-G-Säule binden und damit schließlich in die Probe gelangen, wäre die korrekte Bezeichnung des Verfahrens ‚IgG Anreicherung‘. Da jedoch der Begriff ‚IgG Aufreinigung‘ im allgemeinen Gebrauch geläufiger ist, wird er hier weiterverwendet.

Die Konzentrationsbestimmung von ADRB1- und ADRB2-ab im Serum und im angereicherten IgG erfolgte durch die CellTrend GmbH (Luckenwalde, Deutschland)<sup>85</sup>.

#### **2.4 Konzentrationsbestimmung der IgG mittels Bradford Assay für Protein/IgG Bestimmung**

Die Messung der Proteinkonzentrationen erfolgte mittels Bio-Rad Protein Assay nach der Bradford Methode<sup>86</sup> und nach Anleitung des Herstellers<sup>87</sup>. Die Proben wurden zuvor 1:400 verdünnt. 5 Standardverdünnungen wurden hergestellt. Jede Probe und jede Standardverdünnung wurde in Doppelbestimmung gemessen.

Bei dem Bradford Assay für Protein/IgG Bestimmung handelt es sich um eine Methode zur Feststellung von Konzentrationen über die Bindung eines Farbstoffs an Protein<sup>86</sup>. Da die Konzentrationsbestimmung in den via Affinitätschromatographie aufgereinigten IgG stattgefunden hat, kann man davon ausgehen, dass das einzig in der Probe enthaltene Protein IgG war. Jedoch kann keine Aussage darüber getroffen werden, wie viele der gemessenen Proteine intakte Antikörper waren und bei welchem Anteil es sich um Fragmente von zerstörten IgG gehandelt hat. Da allerdings nicht auszuschließen ist, dass auch IgG-Fragmente eine stimulierende Wirkung haben können und da alle Proben nach Möglichkeit gleich behandelt wurden, es also nicht davon auszugehen ist, dass einige Proben deutlich mehr zerstörte IgG enthalten als andere, stellt der Bradford Assay für Protein/IgG Bestimmung eine einfache und erprobte Möglichkeit der Konzentrationsbestimmung dar.

## **2.5 Zellkultur**

### **2.5.1 THP-1 Zellkultur**

THP-1 Zellen sind eine humane, akute monozytisch leukämische Zelllinie, die ursprünglich im Jahre 1978 aus dem Blut eines einjährigen Jungen mit Rezidiv einer akuten monozytischen Leukämie isoliert wurde<sup>88</sup>. Anhand verschiedener Kriterien ließ sich feststellen, dass es sich bei den THP-1 Zellen um eine Zelllinie handelt, die ihre monozytären Eigenschaften in Kultur über einen Zeitraum von 14 Monaten behält<sup>89</sup>.

Die THP-1 Zellen wurden in RPMI 1640 Medium, versetzt mit 10% hitzeinaktiviertem FBS, 1% Penicillin/ Streptomycin, 10mM HEPES und 0,05mM 2-Mercaptoethanol, bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Zellkulturflaschen im CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert. Eine Passage der Zellen erfolgte alle 3-4 Tage.

### **2.5.2 PBMC Isolation und Kultur**

Für die PBMC Isolation wurde venöses Blut in Lithium-Heparin-Röhrchen abgenommen und kurz geschwenkt. Das Blut wurde anschließend im Verhältnis 1:1 mit PBS bei Raumtemperatur gemischt. Wieder im Verhältnis 1:1 wurde Bicol® mit

der Blut-PBS Mischung überschichtet und dann bei 800 x g bei Raumtemperatur für 25 Minuten zentrifugiert. In der Zentrifuge war hierbei die Bremse ausgeschaltet und die Beschleunigung minimal eingestellt. Nach der Zentrifugation wurde die oberste Phase abgesaugt und verworfen und die zweite Phase, welche die PBMC enthält, in ein neues Gefäß überführt. Mit RPMI 1640 Medium ohne Zusätze wurden die abgenommenen PBMC auf 50 mL aufgefüllt und bei 650 x g und Raumtemperatur für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das entstandene Zellpellet mit 20 mL Medium resuspendiert. Für die Neubauer-Zählkammer wurden 10 µL der Zellsuspension abgenommen und die Zellkonzentration ermittelt. Währenddessen wurde die Zellsuspension erneut 10 Minuten bei 650 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet unmittelbar weiterverwendet. Im Rahmen der Stimulierungsversuche wurden die PBMC unmittelbar nach der Isolation weiterverwendet. Eine Kultur der Zellen erfolgte nur im Rahmen der Versuche mit im Nachfolgenden angegebenen Zusätzen von beispielsweise LPS. Die PBMC wurden im Rahmen von Inkubationszeiten in RPMI 1640 Medium ohne Zusätze und im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

## **2.6 Stimulierungsversuche**

### **2.6.1 THP-1 Stimulierung**

Der Inhalt der THP1-Zellkulturflasche (T175) wurde in ein 50mL Röhrchen gegeben, bei 500 rpm und Raumtemperatur 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand abgekippt. Mit 20 mL PBS wurde das Zellpellet resuspendiert, es wurden 10 µL Suspension zum Zählen mit der Neubauer Zählkammer abgenommen und das 50 mL Röhrchen wurde erneut bei 500 rpm und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert, sowie der Überstand erneut verworfen. Die Konzentration der Zellen in Zellen/mL wurde berechnet und das Zellpellet wurde mit Medium auf die gewünschte Konzentration von  $1,66 \times 10^6$  Zellen/mL verdünnt. 300 µL der Zellsuspension wurde in jedes benötigte Well einer 24-Well-Platte gegeben und die Platte wurde für 30 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert. Bei allen Proben und Kontrollen wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden den Zellen PMA in der Konzentration 10 ng/mL und Ionomycin in der Konzentration 0,5 mg/mL zugefügt und die jeweiligen Wells auf

600 µL mit Medium aufgefüllt. Als Negativkontrolle wurden den Zellen 100 µL PBS zugefügt und die jeweiligen Wells auf 600 µL mit Medium aufgefüllt. Von den Proben wurden jeweils 100 µL der Konzentration 6 mg/mL und 200 µL Medium in die jeweiligen Wells gegeben. Der Platte wurden in Doppelbestimmung je 600 µL Medium als Sterilkontrolle zugefügt und sie wurde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im CO<sub>2</sub>-Inkubator für 24 Stunden inkubiert. Danach wurde die Sterilkontrolle überprüft, die Zellsuspensionen abgenommen, in einem Kühlblock jeweils in Reaktionsgefäße gegeben und bei 400 x g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden im Kühlblock in neue Reaktionsgefäße gegeben und bei -20°C eingefroren, die zurückbleibenden Zellpellets wurden bei -80°C eingefroren.

### **2.6.2 Ermittlung der optimalen Stimulierungsdauer für die PBMC Stimulierung**

Die Zeit, in der die TNF-α Konzentration in Folge der LPS-Stimulierung im Überstand am höchsten war, wurde als idealer Zugabezeitpunkt für die IgG ermittelt. Hierbei wurden die Zellen nach der in Abschnitt 2.5.2 beschriebenen Isolation auf  $1,66 \times 10^6$  Zellen/mL verdünnt und jeweils 150 µL in Wells einer 48-Well-Platte gegeben (PBMC n=1). Zu den Zellen wurden mit Ausnahme zweier Wells für die Negativkontrolle in Doppelbestimmung LPS in der Endkonzentration 2 ng/mL gegeben und die Wells anschließend auf 300 µL Füllvolumen aufgefüllt. Für die Negativkontrollen wurden je 50 µL PBS und 100 µL Medium zugegeben. Die Platten wurden im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> 2h, 4h, 6h, 12h, 18h, 24h und 42h inkubiert. Die Proben wurden dann auf einem Kühlblock abgenommen, wobei die Zellen mit einer Pipettenspitze möglichst vom Boden der 48-Well-Platte abgekratzt wurden, und bei 4°C und 400 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Erneut wurden die Überstände abgenommen und in neue Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden bei -20°C gelagert. Die übrig gebliebenen Zellpellets wurden kurz in flüssigen Stickstoff gegeben und dann bei -80°C gelagert. Die TNF-α-Konzentrationen wurden mithilfe eines spezifischen, in Abschnitt 2.7.2 beschriebenen, ELISA ermittelt. Nach 6-stündiger Inkubation wurde die höchste TNF-α-Konzentration im Überstand ermittelt, sodass dies als die optimale Stimulierungsdauer angenommen und bei der PBMC-Stimulierung als Inkubationszeit verwendet wurde. Die mit LPS vorstimulierten PBMC werden im Nachfolgenden als ‚geprint‘ bezeichnet.

### **2.6.3 PBMC Stimulierung**

Die wie in Abschnitt 2.5.2 beschrieben isolierten PBMC wurden mit Medium auf eine Konzentration von  $3,33 \times 10^6$  Zellen/mL verdünnt. Von der Zellsuspension wurden je 300  $\mu$ L in Wells einer 24-Well-Platte gegeben (PBMC n=2). In jedes Well, mit Ausnahme von zweien für die Negativkontrolle, wurde LPS in der Konzentration 2 ng/mL gegeben. Für die Negativkontrolle wurden in Doppelbestimmung 100  $\mu$ L PBS verwendet. Alle Wells wurden schließlich mit Medium auf 600  $\mu$ L Füllvolumen aufgefüllt und im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 6h inkubiert. Die IgG-Proben (insgesamt 6 Proben pro Gruppe, je 3 Proben pro Gruppe pro Versuch) wurden zunächst mit Medium auf eine Konzentration von 7 mg/mL verdünnt. Hiervon wurden anschließend 1:10 Verdünnungen angefertigt, sodass jede Probe auch in einer Konzentration von 700  $\mu$ g/mL vorlag. Von jeder Probe wurden in Doppelbestimmung je 100  $\mu$ L zu den vorher geprimten Zellen gegeben, sodass Endkonzentrationen von 1 mg/mL bzw. 100  $\mu$ g/mL vorlagen. Zusätzlich wurden in Doppelbestimmung je 100  $\mu$ L PBS als LPS-Kontrolle zugegeben und die Platte im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 24h inkubiert. Die Proben wurden dann auf einem Kühlblock abgenommen, wobei die Zellen mit einer Pipettenspitze möglichst vom Boden der 24-Well-Platte abgekratzt wurden, und bei 4°C und 400 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Erneut wurden die Überstände abgenommen und in neue Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden bei -20°C gelagert. Die übrig gebliebenen Zellpellets wurden kurz in flüssigen Stickstoff gegeben und dann bei -80°C gelagert.

## **2.7 ELISA**

### **2.7.1 Human CCL18/PARC DuoSet ELISA**

Die Messung der CCL18 Konzentration im Zellkulturüberstand der THP-1-Zellen erfolgte mit Hilfe des Human CCL18/PARC DuoSet ELISA nach Angaben des Herstellers<sup>90</sup>. Die Proben wurden mit Ausnahme der Negativkontrollen in 1:10 Verdünnung gemessen. Die Messung der Absorption erfolgte durch eine Subtraktion der bei 595 nm gemessenen Werte von denen, die bei 450 nm gemessen wurden.

### **2.7.2 ELISA Max Standard Set Human TNF- $\alpha$**

Die Messung der TNF- $\alpha$  Konzentration im Zellkulturüberstand der PBMC erfolgte mit Hilfe des ELISA Max Standard Set Human TNF- $\alpha$  nach Angaben des Herstellers<sup>91</sup>. Die Proben wurden z.T. unverdünnt und z.T. in 1:10 Verdünnung gemessen. Bei Werten, bei denen die 1:10 Verdünnung nicht in den Bereich des Standards fielen, wurde der ELISA in 1:100 Verdünnung wiederholt. Die Messung der Absorption erfolgte durch eine Subtraktion der bei 595 nm gemessenen Werte von denen, die bei 450 nm gemessen wurden.

### **2.7.3 ELISA Max Standard Set Human IL-10**

Die Messung der IL-10 Konzentration im Zellkulturüberstand der PBMC erfolgte mit Hilfe des ELISA Max Standard Set Human IL-10 nach Angaben des Herstellers<sup>92</sup>. Die Proben wurden z. T. unverdünnt und z. T. in 1:10 Verdünnung gemessen. Die Messung der Absorption erfolgte durch eine Subtraktion der bei 595 nm gemessenen Werte von denen, die bei 450 nm gemessen wurden.

## **2.8 HEK-Blue™ LPS Detection Kit 2**

Die Bestimmung von LPS-Verunreinigungen der Proben erfolgte mit Hilfe des HEK-Blue™ LPS Detection Kit 2 nach Angaben des Herstellers<sup>93</sup>. Die HEK-Blue™ Zellen wurden in DMEM High Glucose mit 10% hitzeinaktiviertem FBS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Normocin bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Zellkulturflaschen im CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert. Bei einer Konfluenz von etwa 80% wurden die Zellen mit Hilfe von 0.05% Trypsin-EDTA passagiert. Von jeder IgG-Probe wurde vor dem Test eine Verdünnungsreihe (unverdünnt, 1/3, 1/10, 1/30, 1/100, 1/300, 1/1000, 1/3000 und 1/10000) angefertigt, bei wiederholten Messungen wurde zum Einsparen von Probenmaterial mit der 1/10 bzw. 1/30 Verdünnung begonnen. Vom Standard wurde ebenfalls eine Verdünnungsreihe angefertigt (9 Konzentrationen von 1 EU/mL - 0.004 EU/mL). Zu jeder Probe und zu dem Standard wurde ein Blank aus endotoxinfreiem Wasser angelegt. Je 20  $\mu$ L der Verdünnungen jeder Probe und des zugehörigen Blanks wurden sowohl in Doppelbestimmung mit je 20  $\mu$ L endotoxinfreiem Wasser als auch in Doppelbestimmung mit je 20  $\mu$ L Endotoxin Standard Spike Solution (Standard in

der Konzentration 0.1 EU/mL) in eine sterile 96-Well-Platte gegeben. Die Verdünnungen des Standards und der zugehörige Blank wurden in Doppelbestimmung mit je 20 µL endotoxinfreiem Wasser in die 96-Well-Platte gegeben. Die HEK-Blue™ Zellen wurden gezählt, auf  $1-5 \times 10^5$  Zellen/mL verdünnt und je 160 µL der Zellsuspension in jedes Well gegeben. Die Platten wurden 18-24h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert. In eine neue 96-Well-Platte wurden je 180 µL QuantiBlue Solution vorgelegt und 20 µL aus den Wells der inkubierten Platte jeweils in das korrespondierende Well der neuen Platte gegeben. Die Platten wurden auf dem Vortex gemischt, für eine Stunde inkubiert und bei 655 nm gemessen. Anhand der Standardkurve wurden die Endotoxinkonzentrationen sowohl für die Proben als auch für die mit Endotoxin Standard Spike Solution versetzten Proben bestimmt. Hierbei wurde eine Differenz von >25% zwischen Absorption der Proben und der jeweiligen Probe mit Endotoxin Standard Spike Solution als Hinweis auf eine inhibitorische Wirkung der jeweiligen Proben-Verdünnung auf den Assay gewertet und folglich nicht verwendet. Proben, bei denen sich nach diesem Kriterium keine verwendbare Absorption fand, wurden wiederholt getestet. War es dennoch nicht möglich, einen  $\leq 25\%$  Wert zu ermitteln, wurden jene Proben als nicht auswertbar bezeichnet.

Es ist beschrieben, dass bakterielles LPS insbesondere bei Monozyten die Sekretion inflammatorischer Zytokine, wie bspw. TNF- $\alpha$ , induziert<sup>94</sup>. Ich habe den LPS-Gehalt der IgG-Proben bestimmt, um herauszufinden, ob die Zytokinsekretion nach der Stimulierung von humanen Immunzellen mit IgG auf LPS-Verunreinigungen zurückzuführen ist. Beim HEK-Blue™ LPS Detection Kit 2 wird nicht angegeben, welche Endotoxin-Werte als niedrig oder hoch angesehen werden sollten. Das im Zellkulturmedium verwendete FBS hat einen Endotoxingehalt von <5 EU/mL, der als sehr niedrig angesehen wird (VLE=very low endotoxin=sehr niedriges Endotoxin)<sup>95</sup>. Darauf basierend weisen die IgG entweder einen sehr niedrigen Endotoxingehalt (0-3.45 EU/mL, Median: 0.71 EU/mL) auf oder liegen unter dem Detektionsminimum. Aufgrund der niedrigen Werte kann man erwarten, dass das in den IgG vorhandene LPS keinen substantiellen Beitrag zur Zytokinfreisetzung von humanen Immunzellen leistet.

## 2.9 MycoSPY® Master Mix - PCR Mykoplasmen Test Kit

Zur Detektion von Mykoplasmen im Zellkulturmedium der PBMC wurde ein Mykoplasmen Test mit Hilfe des MycoSPY® Master Mix - PCR Mykoplasmen Test Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt<sup>96</sup>.

## 2.10 RayBio® Human Cytokine Antibody Array 5 (G-Series)

Zur Detektion weiterer Zytokine im Zellkulturüberstand der mit IgG stimulierten THP-1 Zellen wurde der RayBio® Human Cytokine Antibody Array 5 (G-Series) nach Angaben des Herstellers verwendet<sup>97</sup>. Die Proben wurden unverdünnt und in einem Volumen von je 100 µL auf den Array gegeben. Zur Messung der Absorption via Laser wurden die bearbeiteten Array-Chips zum Hersteller geschickt.

Auf 3 Arrays wurden insgesamt 10 HC-Proben, 7 SSc-Proben und 4 RZA-Proben sowie eine Negativkontrolle pro Array gegeben (insgesamt 24 Proben).

Die mit Hilfe des Arrays gemessenen Zytokine sind im Folgenden dargestellt.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1	POS1	POS2	POS3	NEG	NEG	NEG	ENA-78	CSF3	CSF2	GRO	GRO-α	I-309	IL-1α
2	POS1	POS2	POS3	NEG	NEG	NEG	ENA-78	CSF3	CSF2	GRO	GRO-α	I-309	IL-1α
3	IL-1β	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10	IL-12 p40/p70	IL-13	IL-15	IFN-γ
4	IL-1β	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10	IL-12 p40/p70	IL-13	IL-15	IFN-γ
5	MCP-1	MCP-2	MCP-3	CSF1	MDC	MIG	MIP-1β	MIP-1δ	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF-β1
6	MCP-1	MCP-2	MCP-3	CSF1	MDC	MIG	MIP-1β	MIP-1δ	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF-β1
7	TNF-α	TNF-β	EGF	IGF-I	ANG	OSM	THPO	VEGF-A	PDGF-BB	LEPTIN	BDNF	BLC	CKβ 8-1
8	TNF-α	TNF-β	EGF	IGF-I	ANG	OSM	THPO	VEGF-A	PDGF-BB	LEPTIN	BDNF	BLC	CKβ 8-1
9	CCL11	CCL24	CCL26	FGF4	FGF6	FGF7	FGF9	Flt-3 LG	CX3CL1	GCP-2	GDNF	HGF	IGFBP1
10	CCL11	CCL24	CCL26	FGF4	FGF6	FGF7	FGF9	Flt-3 LG	CX3CL1	GCP-2	GDNF	HGF	IGFBP1
11	IGFBP2	IGFBP3	IGFBP4	IL-16	IP-10	LIF	LIGHT	MCP4	MIF	MIP-3α	NAP-2	NT-3	NT-4
12	IGFBP2	IGFBP3	IGFBP4	IL-16	IP-10	LIF	LIGHT	MCP4	MIF	MIP-3α	NAP-2	NT-3	NT-4
13	OPN	OPG	PARC	PLGF	TGF-β2	TGF-β3	TIMP1	TIMP2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
14	OPN	OPG	PARC	PLGF	TGF-β2	TGF-β3	TIMP1	TIMP2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

**Abb.4:** Im RayBio® Human Cytokine Antibody Array 5 (G-Series) gemessene Zytokine aus dem RayBio® Human Cytokine Antibody Array 5 (G-Series) Manual des Herstellers<sup>97</sup>.

In der kombinierten Auswertung mit den bereits bestehenden Daten von Murthy et al.<sup>9</sup> wurden die dort erhobenen Daten von intravenösen Immunglobulinen (IVIG) verwendet. Unter IVIG versteht man von Spendern gewonnene Immunglobuline, welche zur Behandlung bestimmter, therapierefraktärer rheumatologischer Erkrankungen sowie weiterer Autoimmunerkrankungen (z.B. Multiple Sklerose) verwendet werden können<sup>98</sup>. Die Herstellung erfolgt durch Alkoholfraktionierung und weitere Reinigungsschritte aus dem gepoolten Plasma von >2000-100000 gesunden Spendern pro Charge<sup>98</sup>. Neben IgG sind in den IVIG weitere Immunglobulin-Isotypen, vor allem IgA, enthalten<sup>99</sup>.

## 2.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 7.0. Zur Erstellung einiger Abbildungen wurde das Programm R verwendet. P-Werte von  $\leq 0.05$  wurden als statistisch signifikant angesehen.

Korrelationen wurden aufgrund der begrenzten Stichprobengröße mittels Spearman Korrelationskoeffizient analysiert.

Die Daten wurden zunächst versuchsbezogen an die LPS-Kontrollen (n=3 je Versuch) angepasst. Hierfür wurden aus den LPS-Kontrollen der verschiedenen Versuche jeweils Mittelwert und Standardabweichung gebildet. Infolgedessen wurde von jedem Messwert der zugehörige Mittelwert abgezogen und anschließend durch die Standardabweichung geteilt.

$$Z = \frac{x - \mu}{\sigma}$$

*Z= angepasster Wert, x= Messwert,  $\mu$ = Mittelwert der LPS-Kontrollen,  $\sigma$ = Standardabweichung der LPS-Kontrollen*

Für den PBMC-Stimulierungsversuch erfolgte die weitere statistische Auswertung durch eine Rang-basierte nicht-parametrische Methode zur Analyse longitudinaler Daten in faktoriellem Kontext (nparLD, Programm R) nach Noguchi et al.<sup>100</sup> mit Hilfe des Instituts für Medizinische Biometrie und Statistik (Dominik Thiele, Cesaire Joris Kuete Fouodo). Hierbei wurden sowohl ein paarweiser Vergleich der einzelnen

Gruppen untereinander (HC, SSc ADRB2 ab<sup>normal</sup> und SSc ADRB2 ab<sup>high</sup>, n=6 pro Gruppe) als auch ein Gruppenvergleich aller drei Stimulierungsgruppen durchgeführt. Aufgrund interexperimenteller Unterschiede wurden die Experimente als Variable betrachtet, darüber hinaus erfolgte eine Betrachtung von Stimulierungsdosis und -gruppe. Zur Betrachtung der Unterschiede bezogen auf jeweils eine Variable erfolgte eine Abstraktion auf die jeweils anderen zwei Variablen. Besonders relevant war hier die Betrachtung von Unterschieden zwischen den Stimulierungsgruppen, unabhängig von Unterschieden der Stimulierungsdosis und von Unterschieden der zwei Experimente. Gleichzeitig konnte hierdurch eine höhere n-Zahl an Proben zur Auswertung verwendet werden.

In der Auswertung werden hier jeweils tabellarisch die p-Werte der Unterschiede bezogen auf eine einzelne Variable (Stimulierungsgruppen, IgG-Konzentration, Spender) unter Abstraktion auf die jeweils beiden anderen, sowie der p-Wert für einen im Nachfolgenden als ‚nicht näher bezeichneten Behandlungseffekt‘ aufgeführten Unterschied, welcher nach Berücksichtigung aller Gruppenunterschiede verbleibt, dargestellt. Weitere p-Werte, die sich aus der Betrachtung zweier Variablen unter Abstraktion auf die letzte ergeben, sind in der Auswertung nicht aufgeführt, da sie für die Fragestellung nicht relevant sind, werden jedoch im Anhang (Punkt 7.4.3) dargestellt. Für die abschließende Darstellung der Unterschiede der Stimulierungsgruppen wurde eine Korrektur für multiples Testen nach Bonferroni durchgeführt.

Die Auswertung der Array Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie (AG Systembiologie, Dr. Axel Künstner).

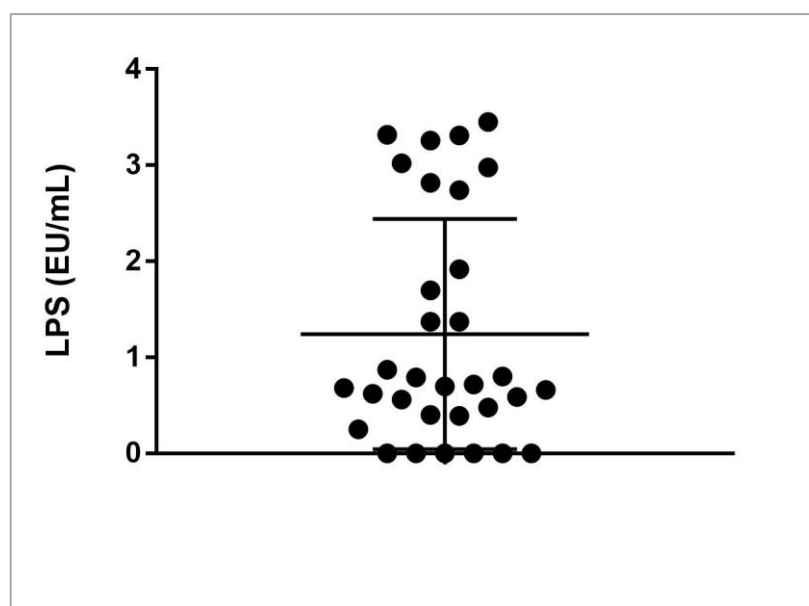
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Die aus humanem Serum aufgereinigten IgG enthalten kein bzw. geringe Mengen an Endotoxin (LPS)

Bei der Messung des LPS-Gehalts der IgG (Messungen für alle Versuche, HC-IgG, SSc-IgG, RZA-IgG und GPA-IgG) ergaben sich die in Tbl. 6 dargestellten Werte. Proben, deren LPS-Gehalt unter der Detektionsgrenze von 0,004 EU/mL lag, wurden als LPS-frei, d.h. 0 EU/mL angesehen (n=6). Die Ergebnisse aller Proben reichten bei einem Median von 0.71 EU/mL bis zu einem Maximalwert von 3.45 EU/mL. Bei 9 Proben wurde kein Ergebnis ermittelt, da im Rahmen der testinternen Kontrollen nicht ausgeschlossen werden konnte, dass diese Proben mit der Aktivierung der HEK-Blue™-Zellen interferieren und so die Absorption beeinflussen.

**Tbl. 6:** Die Ergebnisse des HEK-Blue™ LPS Detection Kit 2 weisen auf keine bzw. geringe Mengen an Endotoxin in den IgG hin.

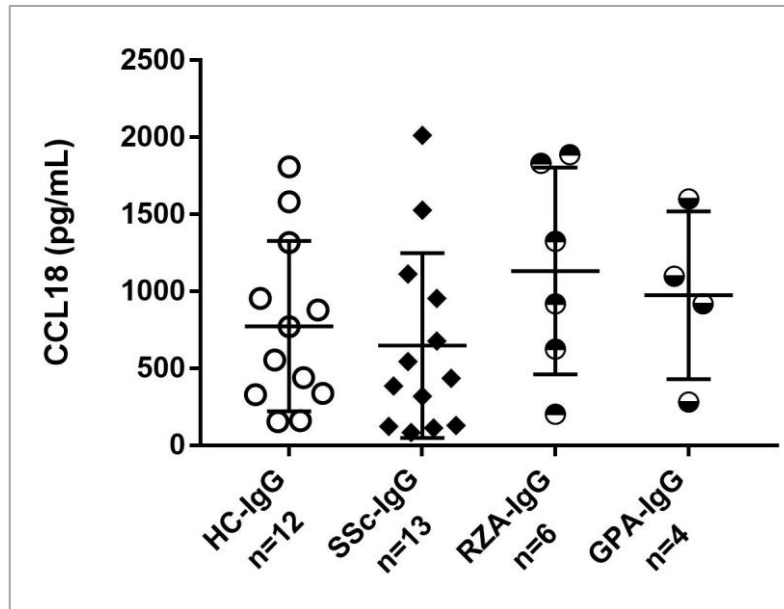
Probenanzahl (gesamt)	41
Probenanzahl (auswertbar)	32
Minimum	0 EU/mL
Maximum	3.45 EU/mL
Median	0.71 EU/mL
95% Konfidenzintervall	0.81-1.68



**Abb.5:** LPS (EU/mL) in den IgG-Proben. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

### 3.2 Die Stimulierung von THP-1 Zellen mit HC-IgG, SSc-IgG, RZA-IgG und GPA-IgG bewirkt keine Veränderung in der Freisetzung von CCL18

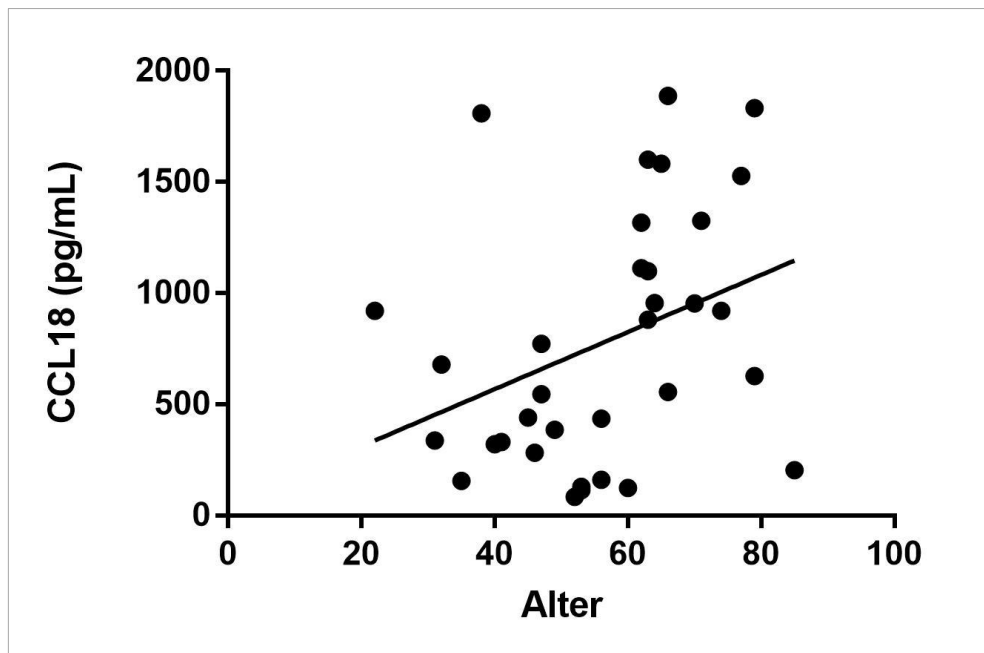
Nach *in vitro* Stimulierung der THP-1 Zellen mit IgG ( $c=1$  mg/mL, 24h), gewonnen aus Seren der verschiedenen Patientengruppen, ließen sich keine Unterschiede (alle  $p > 0.05$ ) in der CCL18-Sekretion feststellen.



**Abb.6:** CCL18 Sekretion (pg/mL) von THP-1 Zellen nach Stimulierung mit HC-, SSc-, RZA- und GPA-IgG. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Die Berechnung der p-Werte erfolgte mit Hilfe eines Kruskal-Wallis Tests. CCL18-Sekretion nach Stimulierung von THP-1 Zellen mit HC-, SSc-, RZA- und GPA-IgG ( $c=1$  mg/mL) für 24h. Die CCL18-Konzentration im Zellkulturüberstand wurde mit Hilfe eines spezifischen ELISA gemessen. HC vs. SSc ( $p_{adj.} > 0.9999$ ), HC vs. RZA ( $p_{adj.} > 0.9999$ ), HC vs. GPA ( $p_{adj.} > 0.9999$ ), SSc vs. RZA ( $p_{adj.} = 0.4895$ ), SSc vs. GPA ( $p_{adj.} > 0.9999$ ), GPA vs. RZA ( $p_{adj.} > 0.9999$ ).

### 3.2.1 Die CCL18-Sekretion von mit IgG stimulierten THP-1 Zellen korreliert mit dem Alter der Spender

Zwischen dem Alter aller IgG-Spender (n=34) und der IgG-induzierten CCL18-Sekretion von THP-1 Zellen wurde eine schwach positive Korrelation festgestellt ( $r=0.42$ ,  $p=0.01$ , Abb. 7). Hingegen wurde zwischen dem LPS-Gehalt der IgG (n=32) und der IgG-induzierten CCL18-Sekretion von THP-1 Zellen keine Korrelation beobachtet ( $r=0.03$ ,  $p=0.88$ ).



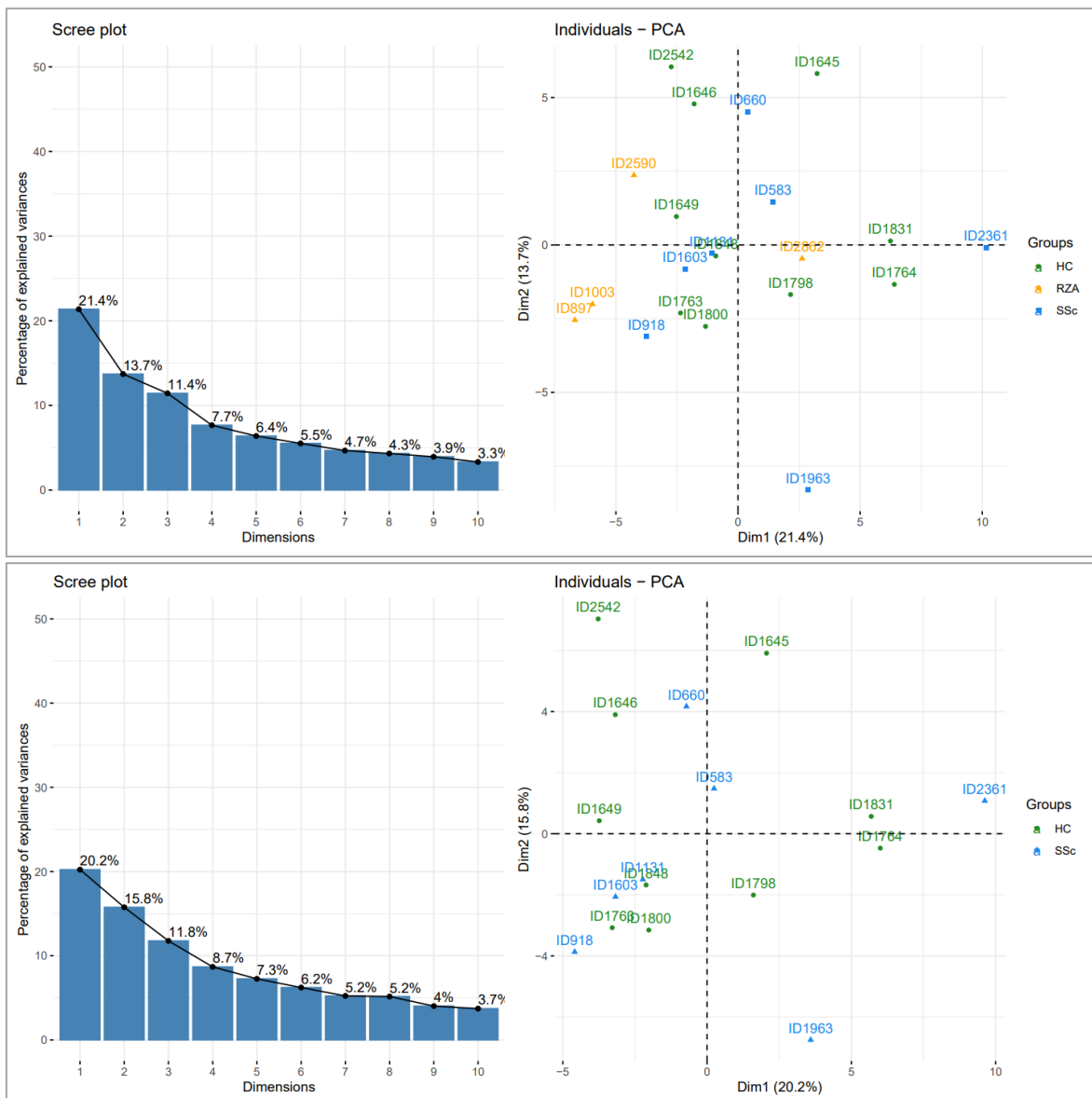
**Abb.7:** Schwach positive Korrelation zwischen Alter der IgG-Spender und IgG-induzierter CCL18-Freisetzung. n=34 (HC=12, SSc=12, RZA=6, GPA=4), ein Ausreißer (SSc) wurde nicht berücksichtigt. Spearman correlation ( $r=0.4206$ ,  $p=0.0132$ ).

### **3.3 Zytokinfreisetzung von THP-1 Zellen nach Stimulierung mit HC-IgG, SSc-IgG oder RZA-IgG**

Mit Hilfe eines Zytokinarrays wurden von THP-1 Zellen sezernierte Zytokine und andere Moleküle nach *in vitro* Stimulierung zwischen SSc-, HC- und RZA-IgG verglichen. Zusätzlich zur Auswertung des einzelnen Arrays wurde eine kombinierte Auswertung mit bereits publizierten Array-Daten, bei denen SSc-IgG und IVIG verwendet wurden<sup>9</sup>, angefertigt. Die Auswertung beinhaltet jeweils eine Hauptkomponentenanalyse zur Untersuchung von Clustering, die Darstellung der verändert sezernierten Zytokine als Volcano Plots und für die kombinierte Auswertung eine Heatmap zur Identifizierung bzw. Darstellung möglicher Cluster.

#### **3.3.1 Die Hauptkomponentenanalyse der Zytokinfreisetzung von THP1-Zellen nach Stimulierung mit HC-IgG, SSc-IgG oder RZA-IgG zeigt kein Clustering**

Anhand der Zytokinfreisetzung ergaben sich in der Hauptkomponentenanalyse (PCA) keine Gruppierungen zwischen den IgG von HC (n=10), SSc (n=7) und RZA (n=4). Dieses Ergebnis bleibt bestehen, wenn nur IgG von HC und SSc analysiert werden. Im Scree-Plot ist zu sehen, dass mit den ersten beiden Dimensionen nur etwa 35% der Varianz eingefangen wird.



**Abb.8:** Hauptkomponentenanalysen und Scree-Plots des Zytokin Arrays. Oben für HC, SSc und RZA, unten für HC und SSc. Das finale Datenset beinhaltet 80 Zytokine und 21 Proben, hiervon 10 HC, 7 SSc und 4 RZA. Datenanalyse mit R.

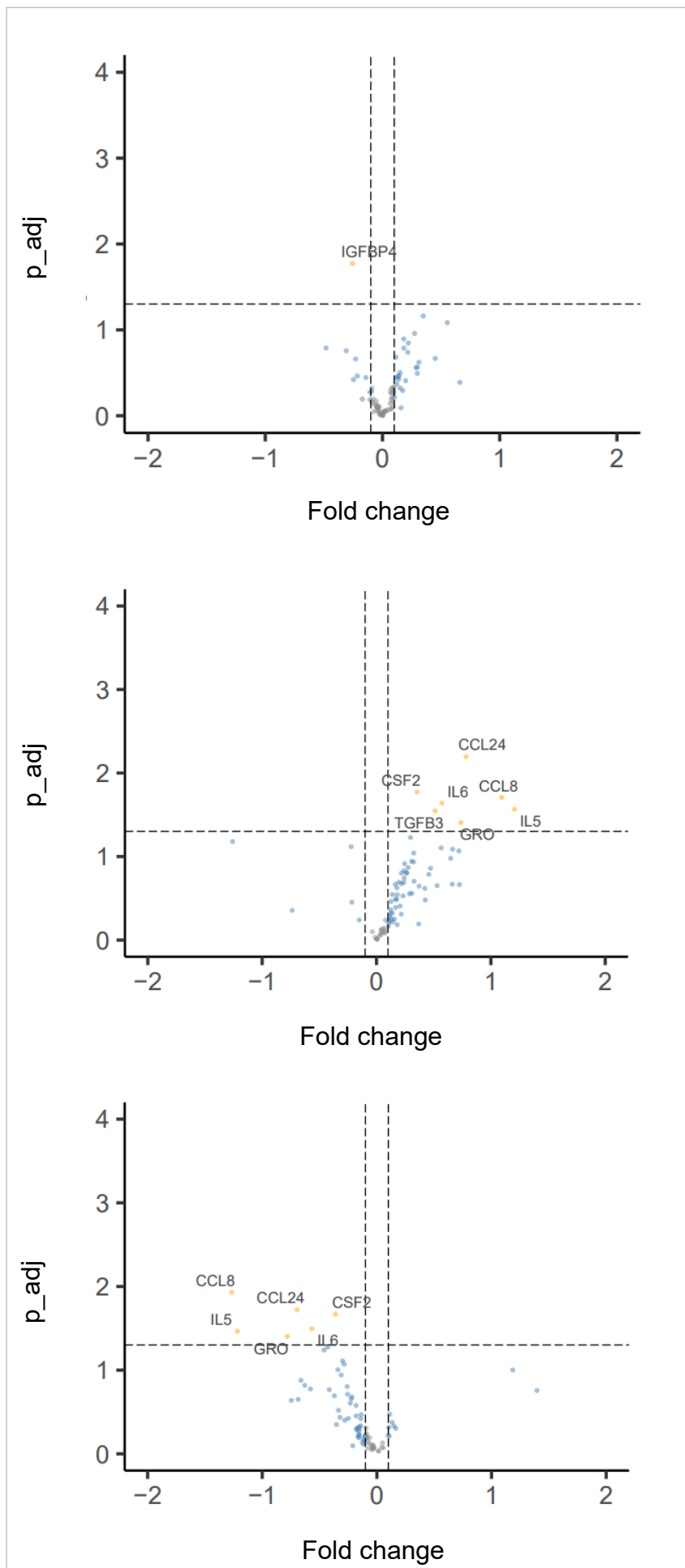
### 3.3.2 Die Stimulierung von THP-1 Zellen mit HC-IgG, SSc-IgG und RZA-IgG bewirkt Unterschiede in der Freisetzung einzelner Zytokine

Anhand von Volcano Plots zeigte sich, dass die *in vitro* Stimulierung von THP-1-Zellen mit HC-IgG, SSc-IgG oder RZA-IgG zu einzelnen Unterschieden in der Zytokinsekretion führt. Der Überblick ist in Tbl. 7 dargestellt. Nach Stimulierung der THP-1 Zellen mit SSc-IgG zeigte sich im Vergleich zu HC-IgG eine verminderte Sekretion von IGFBP4 (Insulin like growth factor binding protein 4). Nach

Stimulierung der THP1-Zellen mit RZA-IgG im Vergleich zu HC-IgG wurden CCL8, CCL24, IL-5, IL-6, CSF2 (Colony stimulating factor 2), TGFB3 (Transforming growth factor  $\beta$ 3) und GRO (Growth-regulated protein) vermehrt sezerniert. Hinsichtlich der Sekretion nach Stimulierung von THP-1 Zellen mit SSc-IgG im Vergleich zu RZA-IgG zeigten sich für RZA-IgG CCL8, CCL24, IL-5, IL-6, CSF2 und GRO erhöht. Die Menge an TGFB3 war bei RZA-IgG gegenüber SSc-IgG nicht verändert. Nach Adjustierung der Messwerte für multiples Testen verblieben keine signifikanten Ergebnisse im Vergleich der drei IgG-Gruppen.

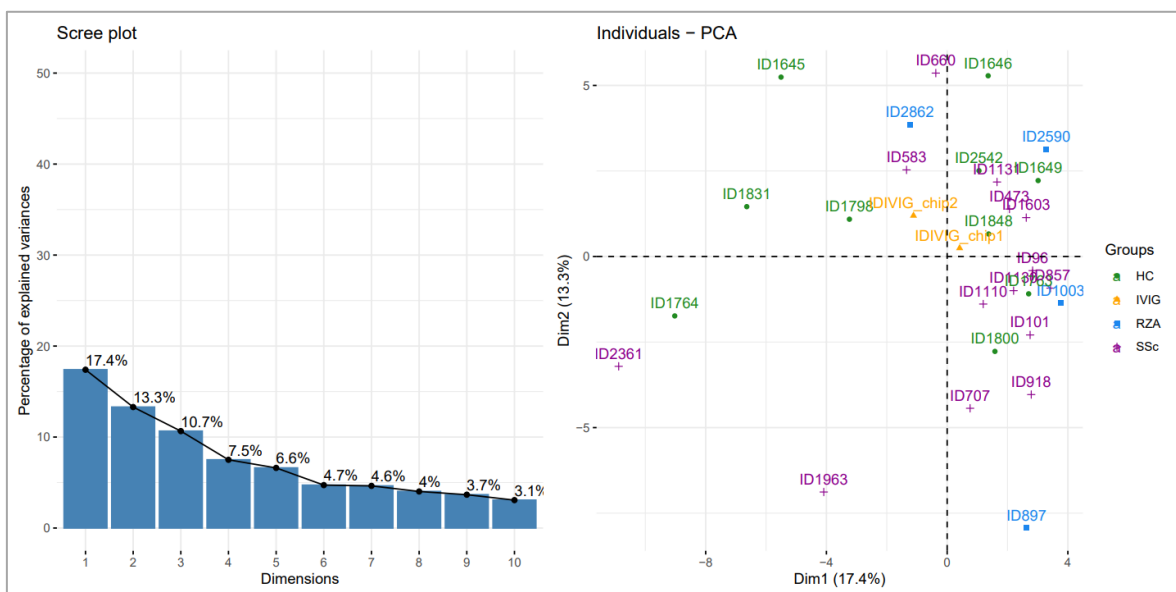
**Tbl.7:** Überblick der Zytokine, die nach Stimulierung der THP-1 Zellen mit SSc-IgG und RZA-IgG im Vergleich zu HC verändert sezerniert werden. P-Werte wurden mit limma berechnet. Nach Adjustierung der Messwerte verblieben keine Signifikanzen, weshalb nur unadjustierte Messwerte dargestellt sind.

	erhöhte Zytokinmenge	verminderte Zytokinmenge
<b>SSc vs. HC</b>	-	IGFBP4 ( $p=0.0169$ )
<b>SSc vs. RZA</b>	-	CCL8 ( $p=0.0118$ ), CCL24 ( $p=0.0189$ ), CSF2 ( $p=0.0215$ ), GRO ( $p=0.0395$ ), IL-5 ( $p=0.0344$ ), IL-6 ( $p=0.0320$ )
<b>RZA vs. HC</b>	CCL8 ( $p=0.0196$ ), CCL24 ( $p=0.0064$ ), CSF2 ( $p=0.0170$ ), GRO ( $p=0.0392$ ), IL-5 ( $p=0.0272$ ), IL-6 ( $p=0.0229$ ), TGFB3 ( $p=0.0284$ )	-



### 3.3.3 Die Hauptkomponentenanalyse der Zytokinfreisetzung von THP-1 Zellen ergibt nach kombinierter Analyse von gemessenen und publizierten Daten ebenfalls kein Clustering

Die Verdopplung der Anzahl von mit SSc-IgG erhaltenen Daten (n=14, Murthy et al. 2021<sup>9</sup>) führt in der Hauptkomponentenanalyse erneut zu keiner Gruppierung für HC (n=10), SSc (n=14) oder RZA (n=4). Lediglich die Zytokinsekretionsmuster der IVIG-Proben aus bereits vorliegenden Daten (Murthy et al. 2021<sup>9</sup>) liegen nah beieinander, was auf eine Gruppierung hindeutet. Im Scree-Plot ist zu sehen, dass mit den ersten beiden Dimensionen nur etwa 30% der Varianz eingefangen wird.



**Abb.10:** Hauptkomponentenanalyse und Scree-Plot des Zytokin Arrays gemeinsam mit Ergebnissen des vorhergegangenen Zytokin Arrays. Es wurden 10 HC, 2 IVIG, 4 RZA und 14 SSc Proben verglichen. Batch-Korrektur zur Behebung interexperimenteller Unterschiede. Datenanalyse mit R.

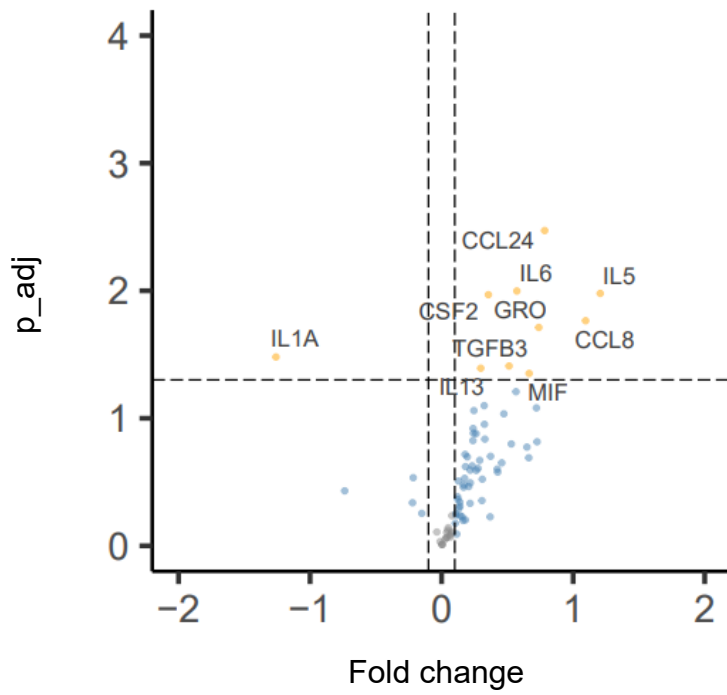
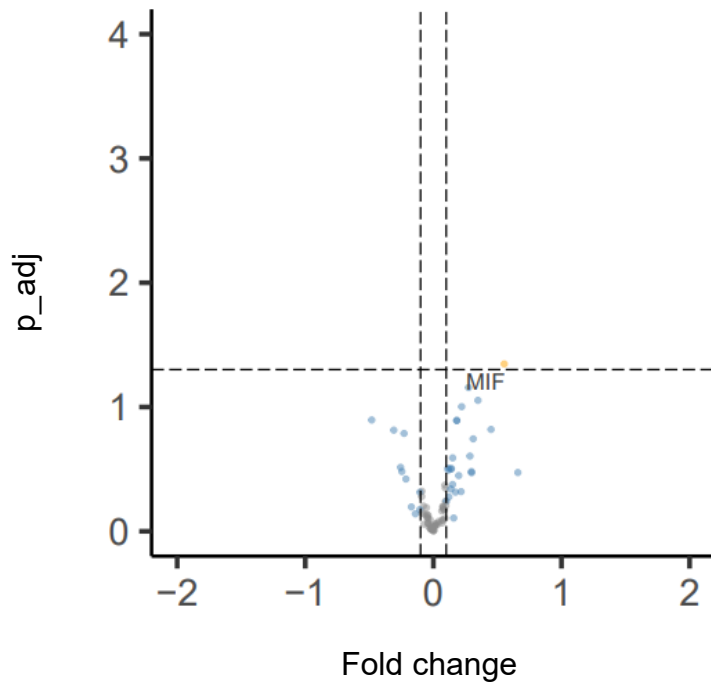
### 3.3.4 Validierung der Zytokinfreisetzung von THP-1 Zellen mit verdoppelter Anzahl an SSc-IgG Messwerten ergibt ähnliche und unterschiedliche Muster

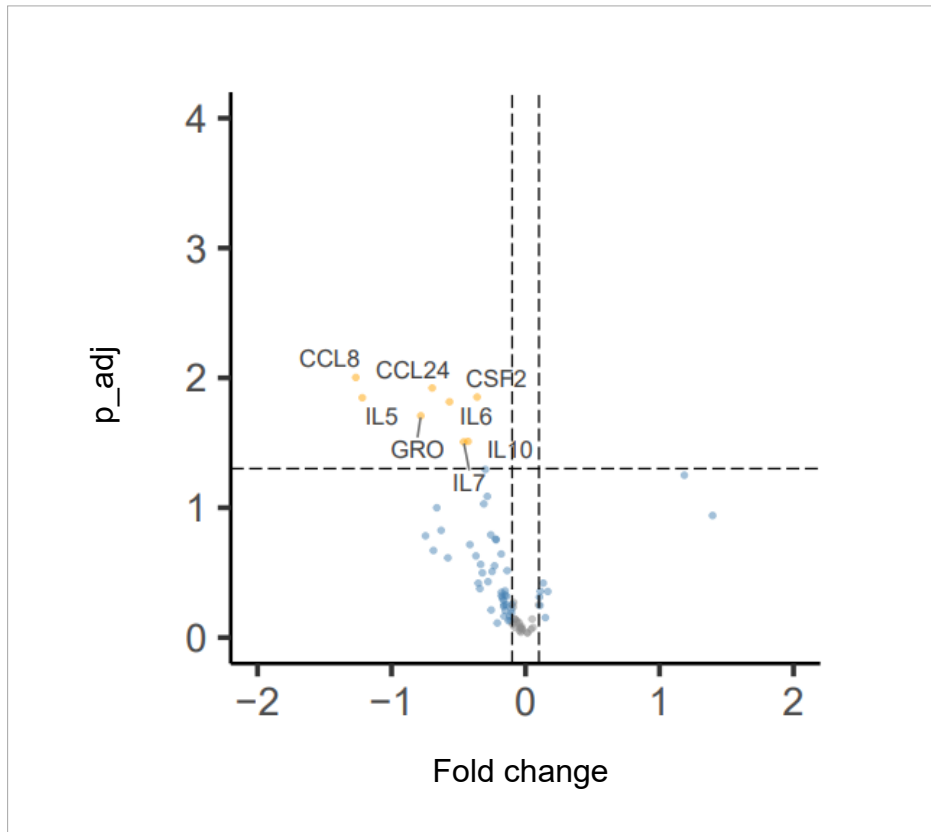
In der kombinierten Auswertung beider Array-Versuche mit Hilfe von Volcano-Plots sind analog zu Tbl. 7 die Unterschiede in der Zytokinsekretion von THP-1 Zellen im Vergleich zwischen SSc-IgG und HC-IgG, RZA-IgG und HC-IgG sowie zwischen SSc-IgG und RZA-IgG dargestellt (Abb. 11). Ein Überblick ist in Tbl. 8 dargestellt. Nach Stimulierung der THP-1 Zellen mit SSc-IgG war die Sekretion von MIF (Macrophage migration inhibitory factor) im Vergleich zu HC-IgG erhöht. Im

Vergleich zwischen RZA-IgG und HC-IgG wurden, in Ergänzung zu den vermehrt sezernierten Zytokinen (CCL8, CCL24, IL-5, IL-6, CSF2, TGFB3 und GRO), IL-13 und MIF gefunden, während IL-1A vermindert sezerniert wurde. Im Vergleich der Zytokinsekretion nach Stimulierung mit SSc-IgG und RZA-IgG zeigten sich für RZA-IgG wieder CCL8, CCL24, IL-5, IL-6, CSF2 und GRO erhöht. Des Weiteren wurden bei Stimulierung mit SSc-IgG IL-7 und IL-10 vermehrt sezerniert. TGFB3 war bei RZA-IgG gegenüber SSc-IgG im Gegensatz zum Vergleich mit HC-IgG nicht erhöht. Auch hier verblieben nach Adjustierung der Messwerte für multiples Testen keine signifikanten Ergebnisse im Vergleich der drei IgG-Gruppen.

**Tbl.8:** Überblick der Zytokine, die bei erhöhter Anzahl an Messwerten nach Stimulierung der THP-1 Zellen mit SSc-IgG und RZA-IgG im Vergleich zu HC verändert sezerniert werden. P-Werte wurden mit limma berechnet. Nach Adjustierung der Messwerte verblieben keine Signifikanzen, weshalb nur unadjustierte Messwerte dargestellt sind.

	erhöhte Zytokinmenge	verminderte Zytokinmenge
<b>SSc vs. HC</b>	MIF ( $p=0.0450$ )	-
<b>SSc vs. RZA</b>	-	CCL8 ( $p=0.0099$ ), CCL24 ( $p=0.0120$ ), CSF2 ( $p=0.0141$ ), GRO ( $p=0.0196$ ), IL-5 ( $p=0.0142$ ), IL-6 ( $p=0.0153$ ), IL-7 ( $p=0.0312$ ), IL-10 ( $p=0.0309$ )
<b>RZA vs. HC</b>	CCL8 ( $p=0.0172$ ), CCL24 ( $p=0.0034$ ), CSF2 ( $p=0.0107$ ), GRO ( $p=0.0194$ ), IL-5 ( $p=0.0105$ ), IL-6 ( $p=0.0101$ ), IL-13 ( $p=0.0405$ ), MIF ( $p=0.0445$ ), TGFB3 ( $p=0.0389$ )	IL-1A ( $p=0.0331$ )





**Abb. 11:** Zytokinsekretion nach Stimulierung von THP-1 Zellen mit IgG (24h) bei erhöhter Anzahl an Messwerten. Auswertung der Daten des Zytokin Arrays gemeinsam mit Daten eines früheren Zytokin Array Versuchs. Vergleich zwischen SSc und HC (oben), RZA und HC (mittig) sowie SSc und RZA (unten). Lineare Regression. Limma Ergebnisse zu  $\ln$ -skalierten Werten. 80 Variablen untersucht. P-Werte gezeigt als  $-\log_{10}$ . Fold change gezeigt als  $\log_2$ . Volcano Plots. Nur signifikante Unterschiede sind dargestellt. Die Werte sind nicht für multiples Testen adjustiert.

SSc vs. HC: MIF ( $p=0.0450$ )

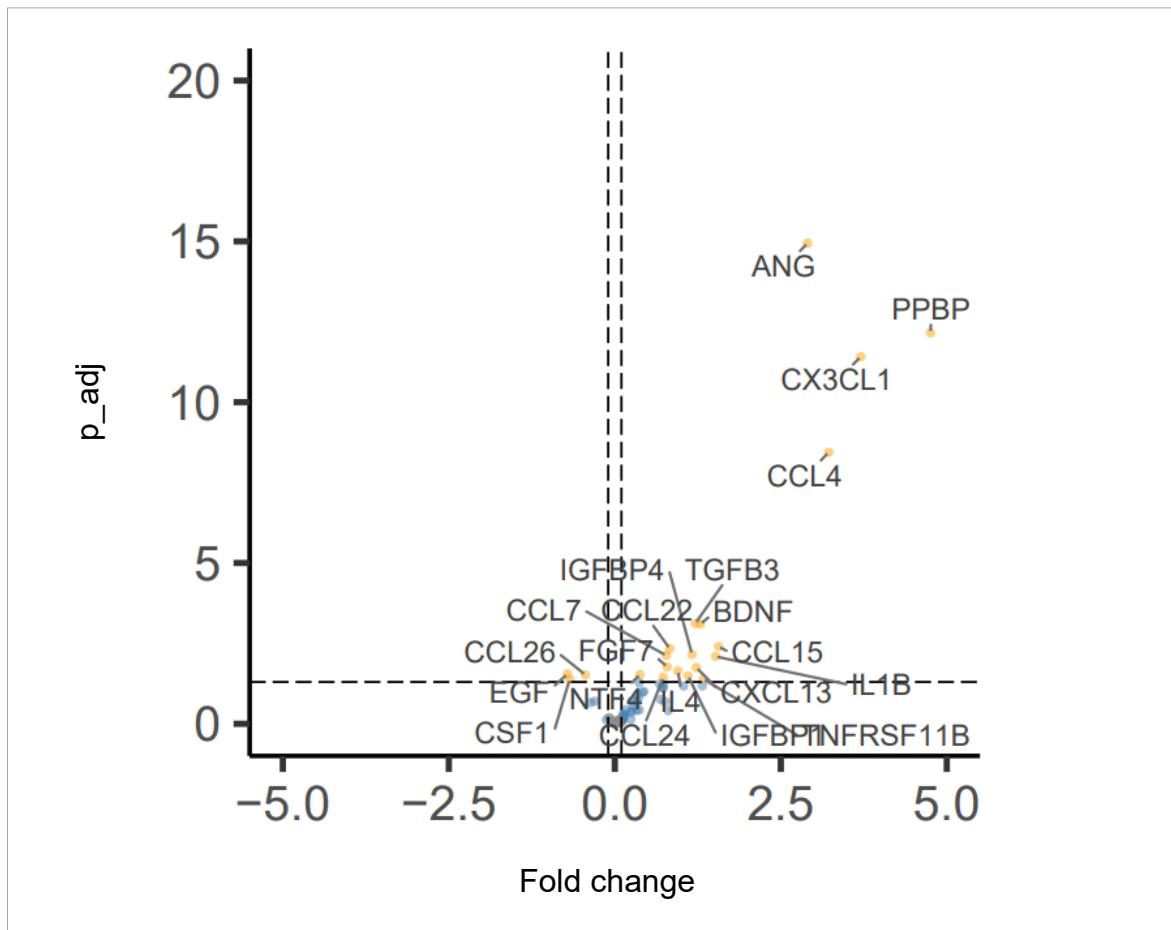
RZA vs. HC: CCL8 ( $p=0.0172$ ), CCL24 ( $p=0.0034$ ), IL-1A ( $p=0.0331$ ), IL-5 ( $p=0.0105$ ), IL-6 ( $p=0.0101$ ), IL-13 ( $p=0.0405$ ), CSF2 ( $p=0.0107$ ), GRO ( $p=0.0194$ ), TGFB3 ( $p=0.0389$ ), MIF ( $p=0.0445$ )

SSc vs. RZA: CCL8 ( $p=0.0099$ ), CCL24 ( $p=0.0120$ ), IL-5 ( $p=0.0142$ ), IL-6 ( $p=0.0153$ ), IL-7 ( $p=0.0312$ ), IL-10 ( $p=0.0309$ ), CSF2 ( $p=0.0141$ ), GRO ( $p=0.0196$ )

Aufgrund der durch SSc- bzw. RZA-IgG hervorgerufenen Zytokinsekretion von THP-1 Zellen ließen sich 15 Zytokine ausmachen, die nach beiden Stimulierungen im Vergleich zu IVIG vermehrt sezerniert wurden. Hierzu gehörten neben 8 Chemokinen (CCL4, CCL7, CCL15, CCL22, CCL24, CXCL13, CX3CL1, PPBP (Pro-platelet basic protein)) und 2 Interleukinen (IL-1B, IL-4) IGFBP4, TNFRSF11B (TNF receptor superfamily member 11B), TGFB3, BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) und ANG (Angiogenin). Im Vergleich zwischen SSc-IgG und IVIG waren zudem FGF7 (Fibroblast growth factor 7), NTF4 (Neurotrophin 4) und IGFBP1 erhöht, während CCL26, EGF (Epidermal growth factor) und CSF1 vermindert sezerniert wurden. Nach Stimulierung von THP-1 Zellen mit RZA-IgG im Vergleich mit IVIG zeigte sich eine erhöhte Sekretion von CCL8, CXCL5 und PDGFB (Platelet-derived growth factor subunit B) sowie eine verminderte Sekretion von CCL20 und CXCL10. Nach Adjustierung der Messwerte für multiples Testen sind im Vergleich von SSc und IVIG BDNF und CCL15 sowie im Vergleich von RZA und IVIG CCL24 erhöht. Eine Übersicht ist in Tbl. 9 dargestellt. Die Zytokine, die jeweils nur nach Stimulierung mit SSc-IgG oder RZA-IgG verändert waren, sind fett markiert.

**Tbl.9:** Überblick der Zytokine, die nach Stimulierung der THP-1 Zellen mit SSc-IgG und RZA-IgG im Vergleich zu IVIG verändert sezerniert werden. P-Werte wurden mit limma berechnet. Die Daten sind ohne (links, rechts) und mit Adjustierung (mittig) dargestellt. Unterschiede im Vergleich zwischen SSc vs. IVIG und RZA vs. IVIG sind fett markiert.

	erhöhte Zytokinmenge (nicht adjustiert)	erhöhte Zytokinmenge (adjustiert)	verminderte Zytokinmenge (nicht adjustiert)
<b>SSc</b>	ANG ( $p < 0.0001$ ), CCL4 ( $p < 0.0001$ ), CX3CL1 ( $p < 0.0001$ ), PPBP ( $p < 0.0001$ ), BDNF ( $p = 0.0008$ ), TGFB3 ( $p = 0.0008$ ), CCL15 ( $p = 0.004$ ), CCL22 ( $p = 0.0046$ ), IGFBP4 ( $p = 0.0070$ ), CCL7 ( $p = 0.0075$ ), IL-1B ( $p = 0.0081$ ), <b>FGF7 (<math>p = 0.0168</math>)</b> , CXCL13 ( $p = 0.0179$ ), IL-4 ( $p = 0.0228$ ), <b>NTF4 (<math>p = 0.0293</math>)</b> , <b>IGFBP1 (<math>p = 0.0326</math>)</b> , CCL24 ( $p = 0.036$ ), TNFRSF11B ( $p = 0.0408$ )	ANG ( $p_{adj} < 0.0001$ ), CCL4 ( $p_{adj} < 0.0001$ ), CX3CL1 ( $p_{adj} < 0.0001$ ), PPBP ( $p_{adj} < 0.0001$ ), <b>BDNF (<math>p_{adj} = 0.0106</math>)</b> , TGFB3 ( $p_{adj} = 0.0106$ ), <b>CCL15 (<math>p_{adj} = 0.0454</math>)</b> , CCL22 ( $p_{adj} = 0.0461$ )	<b>EGF (<math>p = 0.0282</math>)</b> , <b>CCL26 (<math>p = 0.0301</math>)</b> , <b>CSF1 (<math>p = 0.041</math>)</b>
<b>RZA</b>	ANG ( $p < 0.0001$ ), CCL4 ( $p < 0.0001$ ), CX3CL1 ( $p < 0.0001$ ), PPBP ( $p < 0.0001$ ), CCL24 ( $p = 0.0021$ ), TGFB3 ( $p = 0.0021$ ), CCL22 ( $p = 0.0043$ ), BDNF ( $p = 0.0085$ ), IL-1B ( $p = 0.0103$ ), <b>CCL8 (<math>p = 0.0109</math>)</b> , CCL15 ( $p = 0.0110$ ), IL-4 ( $p = 0.0204$ ), CCL7 ( $p = 0.0205$ ), TNFRSF11B ( $p = 0.0221$ ), IGFBP4 ( $p = 0.0253$ ), <b>CXCL5 (<math>p = 0.0359</math>)</b> , CXCL13 ( $p = 0.0374$ ), <b>PDGFB (<math>p = 0.0413</math>)</b>	ANG ( $p_{adj} < 0.0001$ ), CCL4 ( $p_{adj} < 0.0001$ ), CX3CL1 ( $p_{adj} < 0.0001$ ), PPBP ( $p_{adj} < 0.0001$ ), <b>CCL24 (<math>p_{adj} = 0.0283</math>)</b> , TGFB3 ( $p_{adj} = 0.0283$ ), CCL22 ( $p_{adj} = 0.0495$ )	<b>CCL20 (<math>p = 0.0224</math>)</b> , <b>CXCL10 (<math>p = 0.0299</math>)</b> ,

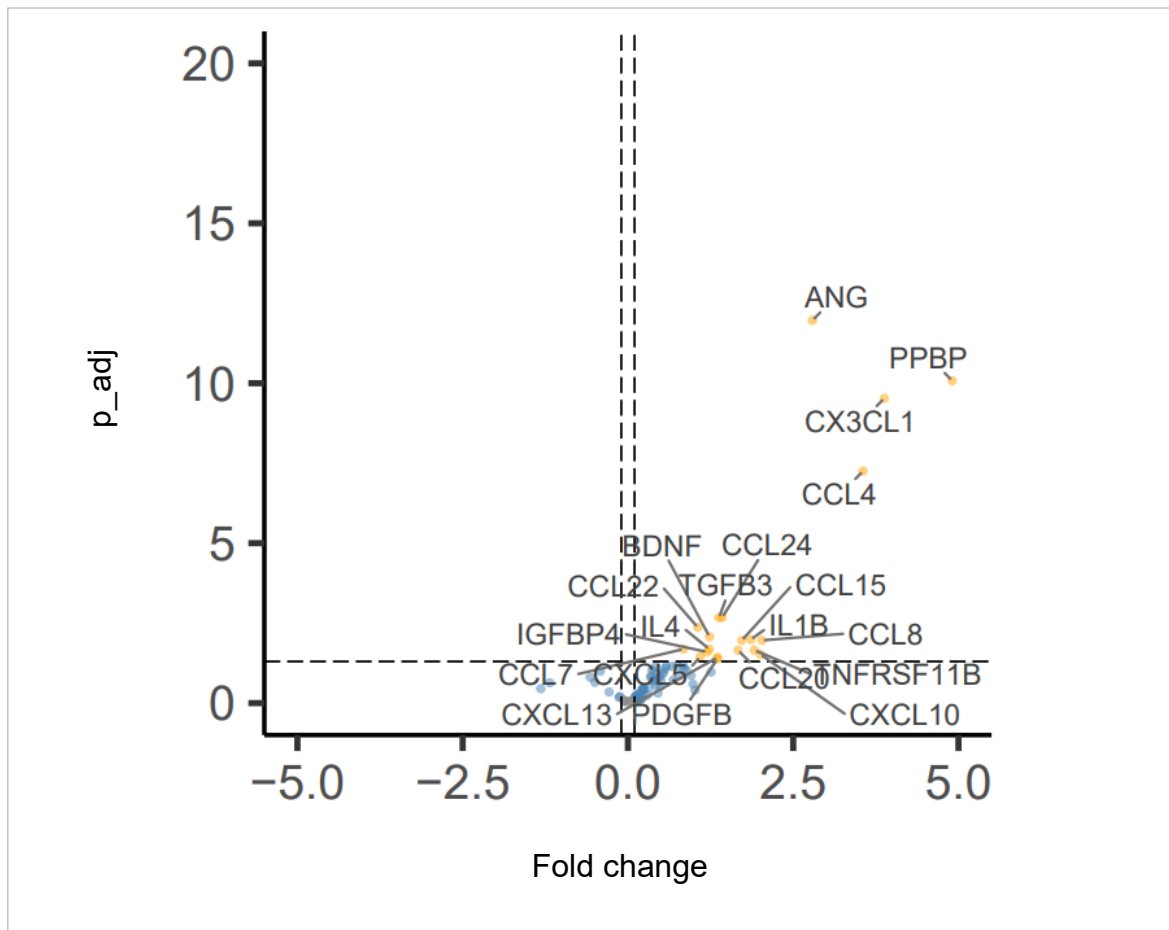


**Abb.12:** Zytokinsekretion nach Stimulierung von THP-1 Zellen mit IgG (24h). Auswertung der Daten des Zytokin Arrays gemeinsam mit Daten eines früheren Zytokin Array Versuchs. Vergleich zwischen SSc und IVIG. Lineare Regression. Limma Ergebnisse zu In-skalierten Werten. 80 Variablen untersucht. P-Werte gezeigt als  $-\log_{10}$ . Fold change gezeigt als  $\log_2$ . Volcano Plots. Nur signifikante Unterschiede sind dargestellt. Die Werte sind nicht für multiples Testen adjustiert.

SSc vs. IVIG: CCL4 ( $p < 0.0001$ ), CCL7 ( $p = 0.0075$ ), CCL15 ( $p = 0.0040$ ), CCL22 ( $p = 0.0046$ ), CCL24 ( $p = 0.0360$ ), CCL26 ( $p = 0.0301$ ), CXCL13 ( $p = 0.0179$ ), CX3CL1 ( $p < 0.0001$ ), PPBP ( $p < 0.0001$ ), IL-1B ( $p = 0.0081$ ), IL-4 ( $p = 0.0228$ ), IGFBP1 ( $p = 0.0326$ ), IGFBP4 ( $p = 0.0070$ ), TNFRSF11B ( $p = 0.0408$ ), TGFB3 ( $p = 0.0008$ ), BDNF ( $p = 0.0008$ ), ANG ( $p < 0.0001$ ), FGF7 ( $p = 0.0168$ ), NTF4 ( $p = 0.0293$ ), EGF ( $p = 0.0282$ ), CSF1 ( $p = 0.0410$ ).

Nach Adjustierung bestehen folgende p-Werte weiterhin signifikant:

SSc vs. IVIG: CCL4 ( $p_{\text{adj.}} < 0.0001$ ), CCL15 ( $p_{\text{adj.}} = 0.0454$ ), CCL22 ( $p_{\text{adj.}} = 0.0461$ ), CX3CL1 ( $p_{\text{adj.}} < 0.0001$ ), PPBP ( $p_{\text{adj.}} < 0.0001$ ), TGFB3 ( $p_{\text{adj.}} = 0.0106$ ), BDNF ( $p_{\text{adj.}} = 0.0106$ ), ANG ( $p_{\text{adj.}} < 0.0001$ ).



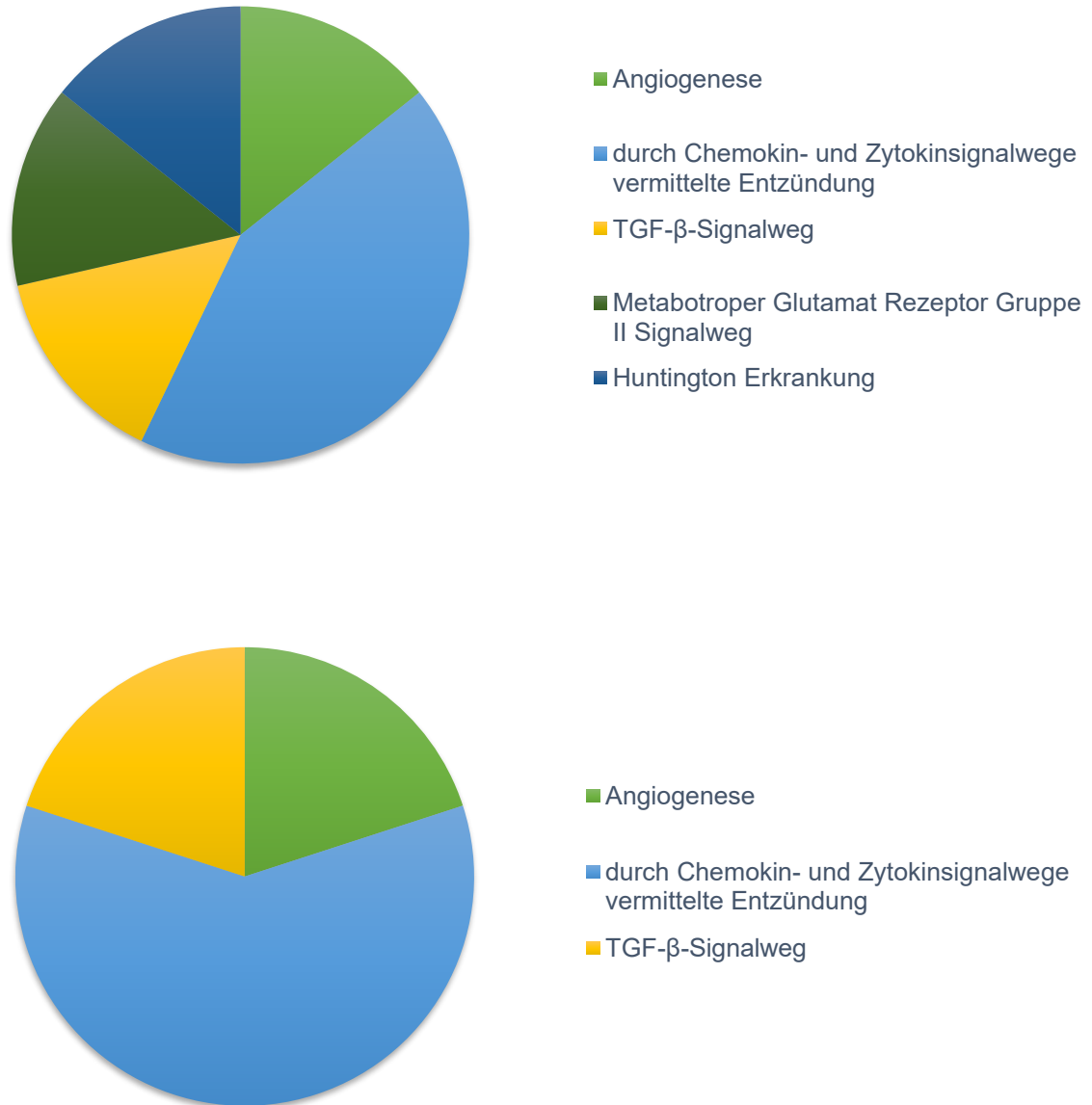
**Abb.13:** Zytokinsekretion nach Stimulierung von THP-1 Zellen mit IgG (24h). Auswertung der Daten des Zytokin Arrays gemeinsam mit Daten eines früheren Zytokin Array Versuchs. Vergleich zwischen RZA und IVIG. Lineare Regression. Limma Ergebnisse zu In-skalierten Werten. 80 Variablen untersucht. P-Werte gezeigt als  $-\log_{10}$ . Fold change gezeigt als  $\log_2$ . Volcano Plots. Nur signifikante Unterschiede sind dargestellt. Die Werte sind nicht für multiples Testen adjustiert. RZA vs. IVIG: CCL4 ( $p < 0.0001$ ), CCL7 ( $p = 0.0205$ ), CCL8 ( $p = 0.0109$ ), CCL15 ( $p = 0.0110$ ), CCL20 ( $p = 0.0224$ ), CCL22 ( $p = 0.0043$ ), CCL24 ( $p = 0.0021$ ), CXCL5 ( $p = 0.0359$ ), CXCL10 ( $p = 0.0299$ ), CXCL13 ( $p = 0.0374$ ), CX3CL1 ( $p < 0.0001$ ), PPBP ( $p < 0.0001$ ), IL-1B ( $p = 0.0103$ ), IL-4 ( $p = 0.0204$ ), IGFBP4 ( $p = 0.0253$ ), TNFRSF11B ( $p = 0.0221$ ), TGFB3 ( $p = 0.0021$ ), BDNF ( $p = 0.0085$ ), ANG ( $p < 0.0001$ ), PDGFB ( $p = 0.0413$ ).

Nach Adjustierung bestehen folgende p-Werte weiterhin signifikant:

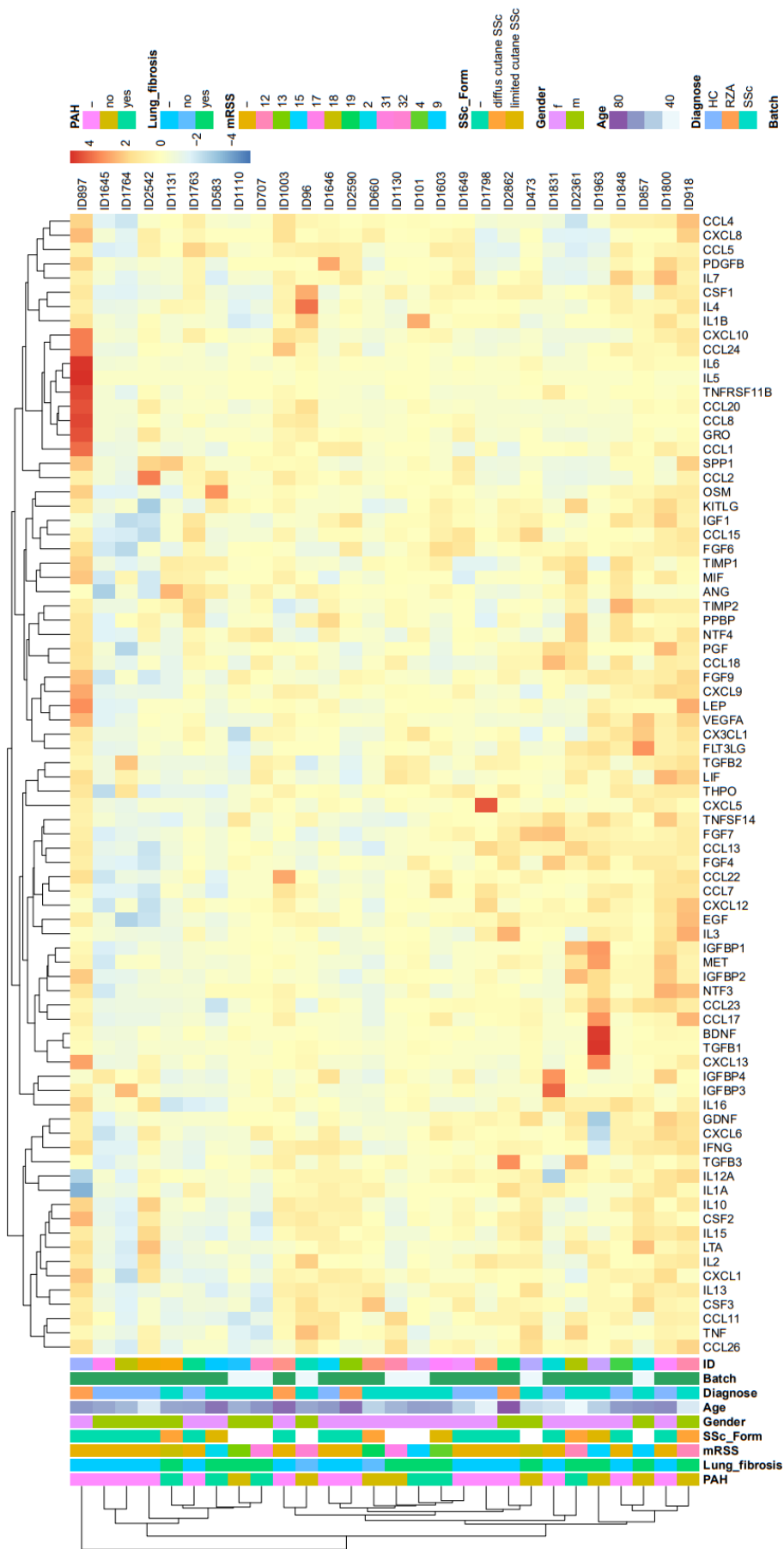
RZA vs. IVIG: CCL4 ( $p_{\text{adj.}} < 0.0001$ ), CCL22 ( $p_{\text{adj.}} = 0.0495$ ), CCL24 ( $p_{\text{adj.}} = 0.0283$ ), CX3CL1 ( $p_{\text{adj.}} < 0.0001$ ), PPBP ( $p_{\text{adj.}} < 0.0001$ ), TGFB3 ( $p_{\text{adj.}} = 0.0283$ ), ANG ( $p_{\text{adj.}} < 0.0001$ ).

Die erstellte Heatmap (s. Abb. 15) zeigte keinerlei Clustering der Zytokinsekretion zwischen den IgG-Proben. Ebenfalls erfolgte kein Clustering zwischen SSc-Patienten mit oder ohne PAH oder Fibrose, in Bezug auf den mRSS oder auf die SSc-Form, auf das Alter oder Geschlecht oder auf die Diagnose HC, RZA oder SSc. Eine *in silico*-Analyse der Signalwege anhand der Zytokine, die im Vergleich zwischen SSc-IgG bzw. RZA-IgG und IVIG verändert sezerniert wurden, ergab, dass der am häufigsten damit in Verbindung gebrachte Signalweg mit ,durch

Chemokin- und Zytokinsignalwege vermittelte Entzündung‘ beschrieben ist (Abb. 14). Dieses gilt bei Berücksichtigung aller signifikant veränderten Zytokine sowohl vor als auch nach der Adjustierung für multiples Testen.



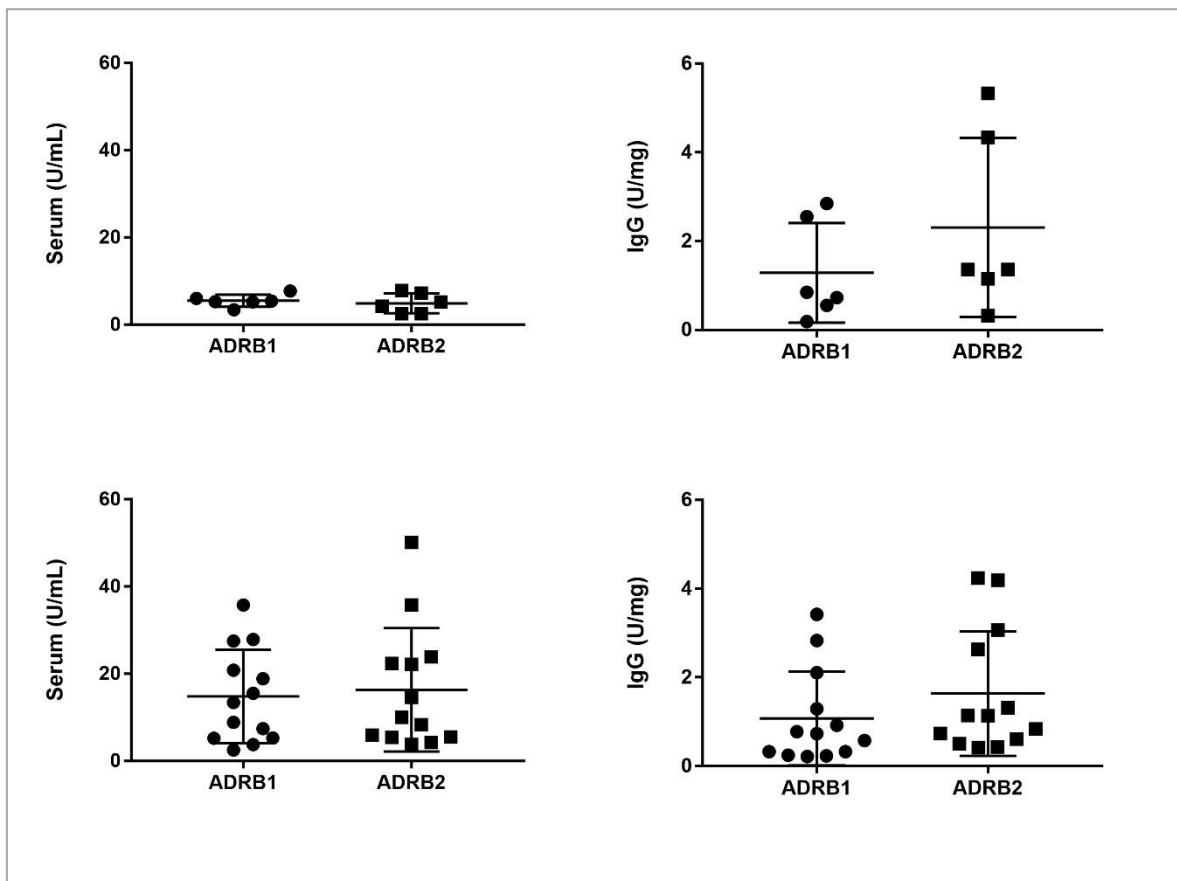
**Abb.14:** Signalweg Analyse mit dem Panther analysis tool (<http://pantherdb.org/>). Oben: 8 Zytokine, deren Höhe nach Stimulierung mit SSc-IgG im Vergleich mit IVIG verändert waren, wurden berücksichtigt und ergaben 7 Signalweg-Treffer. Angiogenese: ANG; Huntington Erkrankung: BDNF; durch Chemokin- und Zytokinsignalwege vermittelte Entzündung: CX3CL1, CCL4, CCL22; Metabotroper Glutamat Rezeptor Gruppe II Signalweg: BDNF; TGF-β-Signalweg: TGFB3. Unten: 7 Zytokine, deren Höhe nach Stimulierung mit RZA-IgG im Vergleich mit IVIG verändert waren, wurden berücksichtigt und ergaben 5 Signalweg-Treffer. Angiogenese: ANG; durch Chemokin- und Zytokinsignalwege vermittelte Entzündung: CX3CL1, CCL4, CCL22; TGF-β-Signalweg: TGFB3. Die Daten wurden jeweils ohne (nicht gezeigt) und mit (gezeigt) Adjustierung für multiples Testen analysiert. Bei jeder Analyse gehörten die meisten Zytokine zum Signalweg ‘durch Chemokin- und Zytokinsignalwege vermittelte Entzündung‘.



**Abb.15:** Heatmap zur Untersuchung eines möglichen Clusterings. Vergleich von 28 Proben (HC: n=10, SSc: n=14, RZA: n=4).

### 3.4 Zirkulierende IgG von Gesunden und SSc Patienten enthalten ADRB1- und ADRB2-Antikörper

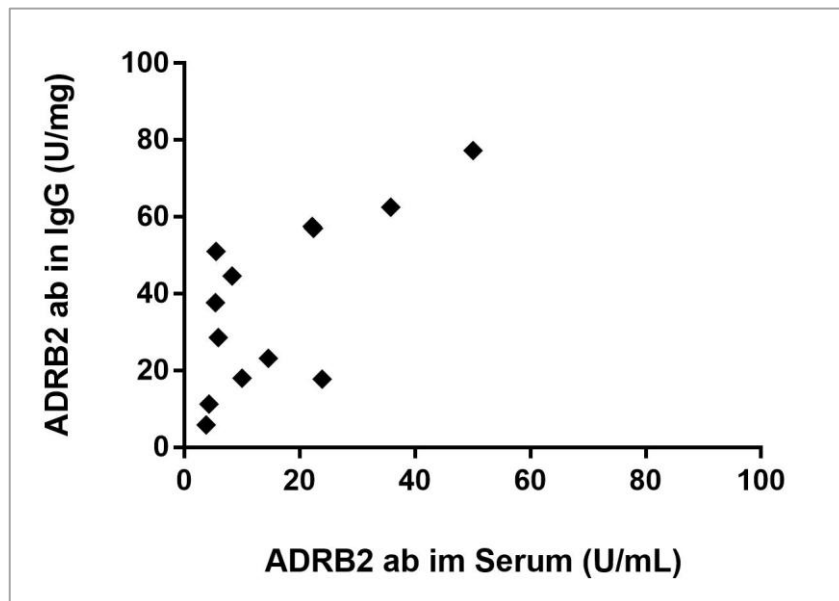
Bei den Gesunden zeigen sich nur geringe Mengen von ADRB1- und ADRB2-Antikörpern im Serum. Bei der SSc-Gruppe treten hingegen deutlich höhere Werte von ADRB1- und ADRB2-Antikörpern im Serum auf (Abb. 16). Bei Normalisierung auf die Proteinmenge finden sich bei den IgG im Hinblick auf die Menge der ADRB1- und ADRB2-Antikörper ähnliche Werte für HC und SSc. Aufgrund der geringen Zahl geeigneter Probanden (zu den Stimulierungsgruppen passende ADRB2-Titer bei gleichzeitig möglichst geringer medikamentöser Therapie) war ein Alters- und Geschlechts-Matching für die nachfolgend durchgeführten PBMC-Stimulierungsversuche nicht vollständig möglich (s. auch Abschnitt 2.2.2).



**Abb.16:** ADRB1- und ADRB2-Antikörperkonzentrationen in HC (oben) und SSc (unten). Man-Whitney Test zum Vergleich von ADRB1 und ADRB2 zeigt keine signifikanten Unterschiede (IgG in HC:  $p=0.3095$ ; Serum HC:  $p=0.5065$ ; IgG in SSc:  $p=0.1534$ ; Serum SSc:  $p=0.8306$ ).

### 3.4.1 Positive Korrelation der ADRB2-Antikörperwerte zwischen Serum und IgG bei der SSc

Für die ADRB2-Antikörperkonzentration ergab sich zwischen Serum und IgG bei der SSc-Kohorte eine positive Korrelation ( $r=0.64$ ,  $p=0.02$ , Abb.17). Hingegen wurden für die ADRB1- und ADRB2-Antikörperwerte zwischen Serum und IgG bei den Gesundkontrollen keine Korrelationen (ADRB1:  $r=0.37$ ,  $p=0.50$ ; ADRB2:  $r=-0.43$ ,  $p=0.39$ ), sowie für die ADRB1-Antikörperkonzentration zwischen Serum und IgG bei der SSc-Kohorte nur ein Trend ( $r=0.53$ ,  $p=0.07$ ) beobachtet.



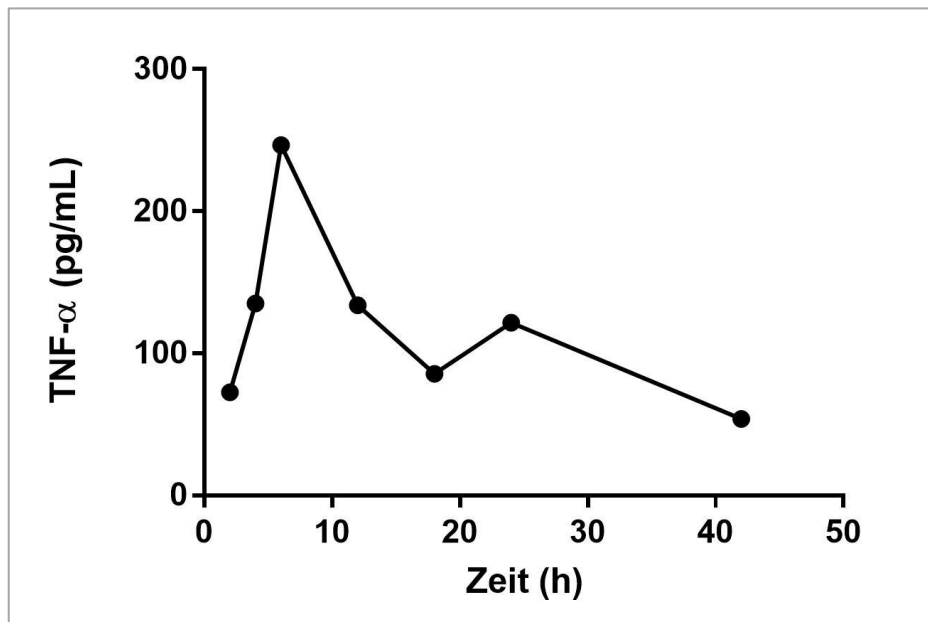
**Abb.17:** Bei der hier untersuchten SSc-Gruppe gehen erhöhte ADRB2-Antikörperkonzentrationen im Serum mit erhöhten ADRB2-Antikörperkonzentrationen im IgG einher. Spearman correlation ( $r= 0.6374$ ;  $p= 0.0221$ ).

### 3.5 Die Ko-Stimulierung geprimter PBMC mit SSc-IgG, welches eine hohe ADRB2-Antikörpermenge enthält, führt zu gesteigerter TNF- $\alpha$ Sekretion

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieses Experiments detailliert aufgeführt. Zunächst werden die Ergebnisse des Vorversuches mit Ermittlung der optimalen Dauer und Konzentration des PBMC-Primings vorgestellt. Anschließend werden die statistischen Verfahren, welche zur Anpassung der Messwerte aufgrund von intra- und interexperimentellen Unterschieden notwendig sind, erläutert und schließlich die Ergebnisse des Hauptversuches dargestellt.

### 3.5.1 Die Stimulierung von PBMC gesunder Spender mit LPS (Priming) bewirkt die Sekretion von TNF- $\alpha$

Als Zellmodell für Stimulierungsversuche wurden zunächst wie bereits in Vorarbeiten beschrieben<sup>9</sup> THP-1 Zellen verwendet. Trotz mehrmaliger Durchführung zeigte sich für die THP-1 Zellen im zeitlichen Verlauf keinerlei TNF- $\alpha$  Sekretion als Antwort auf eine LPS-Stimulierung. Aus diesem Grund wurden anstatt der THP-1 Zellen humane PBMC (n=1) verwendet. Der Zeitpunkt, bei dem sich im PBMC-Zellkulturüberstand am meisten TNF- $\alpha$  feststellen ließ, wurde als optimale Stimulierungsdauer gewertet. Hier wurde eine 6-stündige Stimulierung mit 2 ng/mL LPS als optimale Stimulierungsdauer ermittelt. Die TNF- $\alpha$  Sekretion durch die PBMC nahm zunächst schnell zu und fiel nach 6 Stunden ab. Interessanterweise zeigte sich in dem Zeitraum von 18-24 Stunden ein erneuter leichter Anstieg der TNF- $\alpha$  Sekretion. In parallel durchgeführten Messungen der TNF- $\alpha$  Sekretion nach Stimulierung mit 10 ng/mL LPS zeigte sich die TNF- $\alpha$  Sekretion der PBMC etwas höher als nach Stimulierung mit 2 ng/mL LPS. Aufgrund publizierter Daten<sup>83</sup> und der erzielten Ergebnisse wurde mit einer Stimulierung von 2 ng/mL LPS für 6h weitergearbeitet. Die mit LPS stimulierten PBMC werden im Nachfolgenden als ‚geprimte‘ PBMC bezeichnet.



**Abb.18:** TNF- $\alpha$  Sekretion durch geprimte PBMC (LPS 2 ng/mL) bei sieben Zeitpunkten (2h, 4h, 6h, 12h, 18h, 24h und 42h). Die höchste TNF- $\alpha$  Konzentration im Zellkulturüberstand ließ sich nach 6h feststellen.

### 3.5.2 Statistische Verfahren zur Anpassung intra- und interexperimenteller Unterschiede im PBMC-Stimulierungsversuch

Zur Analyse der TNF- $\alpha$  Sekretion von humanen PBMC nach Priming mit LPS und Ko-Stimulierung mit SSc-IgG wurden 2 Spender, im Nachfolgenden als Versuch 2 und 3 (V2 und V3) bezeichnet, berücksichtigt. Die Ergebnisse mit den PBMC eines ersten Spenders (Versuch 1) wurden aufgrund einer unmittelbar vorhergehenden Immunisierung als verfälschend eingestuft und demzufolge nicht verwendet.

Die TNF- $\alpha$  Sekretion der geprimten PBMC wurde nach Ko-Stimulierung mit IgG, aufgeteilt in drei Gruppen (SSc ADRB2 ab<sup>high</sup>, SSc ADRB2 ab<sup>normal</sup>, HC; genaue Beschreibung der Methodik s. Abschnitt 2.6.3), gemessen. Die Ergebnisse wurden wie folgt berechnet:

Zunächst erfolgte anhand der LPS-Kontrollen der beiden Versuche eine Normalisierung der Messwerte der TNF- $\alpha$  Sekretion. Dafür wurden von den LPS-Kontrollen der beiden Versuche (jeweils n=3) der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung gebildet. Danach wurde von jedem Messwert der Ko-Stimulierung mit IgG der zu dem Versuch gehörige Mittelwert der LPS-Kontrollen subtrahiert und anschließend durch die Standardabweichung dividiert (für Darstellung der Formel zur Normalisierung anhand der LPS-Kontrollen s. Abschnitt 2.11).

Die weitere Analyse der normalisierten Daten erfolgte aufgrund der kleinen Stichprobengröße mit nicht-parametrischen Tests. Hierbei wurden die Unterschiede, die durch den Einsatz verschiedener PBMC-Spender (V2, V3), IgG-Konzentrationen (Dosis 0.1, Dosis 1) und IgG-Stimulierungsgruppen (SSc ADRB2 ab<sup>high</sup>, SSc ADRB2 ab<sup>normal</sup>, HC) auftreten, berücksichtigt. Diese Berechnung erfolgte unter Verwendung einer Rang-basierten nicht-parametrischen Methode zur Analyse longitudinaler Daten in faktoriellem Kontext (nparLD) nach Noguchi et al.<sup>100</sup> (für eine genauere Beschreibung s. Abschnitt 2.11).

Zuerst wurden p-Werte für paarweise Vergleiche zwischen den Stimulierungsgruppen (HC vs. SSc ADRB2 ab<sup>normal</sup>, HC vs. SSc ADRB2 ab<sup>high</sup>, SSc ADRB2 ab<sup>normal</sup> vs. SSc ADRB2 ab<sup>high</sup>) berechnet. Dabei wurden alle drei experimentellen Parameter jeweils als Variable betrachtet, d.h. PBMC-Spender, IgG-Stimulierungsdosis und -gruppe. Zur Betrachtung der Unterschiede bezogen auf eine Variable erfolgte die Abstraktion auf die jeweils anderen zwei Variablen.

Relevant war hier die Betrachtung der Stimulierungsgruppen, abstrahiert auf die Stimulierungsdosis und die PBMC-Spender.

Des Weiteren erfolgte ein Vergleich über alle drei Stimulierungsgruppen (HC, SSc ADRB2 ab<sup>normal</sup> und SSc ADRB2 ab<sup>high</sup>). Da der Vergleich aller Gruppen miteinander eine höhere Stichprobenzahl ermöglicht als der paarweise Vergleich von jeweils 2 Gruppen untereinander, kann diese Auswertung als statistisch aussagekräftiger angesehen werden.

Zur abschließenden Darstellung der Unterschiede der Stimulierungsgruppen wurde für die paarweisen Vergleiche zusätzlich eine Korrektur für multiples Testen nach Bonferroni durchgeführt.

Es wird angenommen, dass dieses Verfahren die vergleichende Analyse der Zytokin-Freisetzung ohne Verfälschung durch inter- und intraexperimentelle Unterschiede ermöglicht.

Zusammenfassend wurden für die TNF- $\alpha$  und IL-10 Sekretion jeweils drei Arten von Analysen durchgeführt:

- 1: Gruppenvergleiche der Stimulierungsgruppen unter Abstraktion auf Dosis und Versuche mit dem Ziel der Herausstellung, ob ein Unterschied besteht, der bezüglich der jeweiligen Zytokinsekretion durch die Stimulierungsgruppen, nicht aber durch die IgG-Konzentrationen oder PBMC-Spender hervorgerufen worden ist.
- 2: Paarweise Vergleiche der Stimulierungsgruppen unter Abstraktion auf Dosis und Versuche mit dem Ziel der Herausstellung der Unterschiede, die bezüglich der jeweiligen Zytokinsekretion zwischen den einzelnen Stimulierungsgruppen im Vergleich bestehen, nicht aber durch die IgG-Konzentrationen oder PBMC-Spender hervorgerufen worden sind.
- 3: Korrektur für multiples Testen nach Bonferroni für die Darstellung der p-Werte der paarweisen Vergleiche zur Erhöhung der statistischen Aussagekraft der Ergebnisse.

Die Ergebnisse der nach oben beschriebener Methode ausgewerteten paarweisen Vergleiche und der Gruppenvergleiche sind im Folgenden dargestellt.

### **3.5.3 Die Ko-Stimulierung von geprimten PBMC mit SSc-IgG ADRB2 ab<sup>high</sup> führt im Vergleich mit HC-IgG zur erhöhten Freisetzung von TNF- $\alpha$**

In Tbl. 10 sind die paarweisen Vergleiche der IgG-Ko-Stimulierungsgruppen im Hinblick auf die TNF- $\alpha$  Sekretion der geprimten PBMC mit den Irrtumswahrscheinlichkeiten für die jeweilige Variable und abstrahiert auf die beiden anderen Variablen dargestellt. Der Vergleich zwischen der Ko-Stimulierung mit HC-IgG und SSc-IgG ADRB2 ab<sup>normal</sup> (abstrahiert auf Spender und IgG-Konzentration) ergibt im Hinblick auf die TNF- $\alpha$  Freisetzung keinen Unterschied ( $p=0.868$ ). Hingegen zeigt sich, dass die Ko-Stimulierung mit SSc-IgG ADRB2 ab<sup>high</sup> im Vergleich zu HC-IgG (abstrahiert auf Spender und IgG-Konzentration) zu einer erhöhten Freisetzung von TNF- $\alpha$  führt ( $p=0.00000337$ ). Mit einem Wert von  $p=0.0025$  deutet auch der Vergleich zwischen SSc-IgG ADRB2 ab<sup>normal</sup> und SSc-IgG ADRB2 ab<sup>high</sup> (abstrahiert auf Spender und IgG-Konzentration) auf eine erhöhte Freisetzung von TNF- $\alpha$  nach Ko-Stimulierung mit SSc-IgG ADRB2 ab<sup>high</sup> hin.

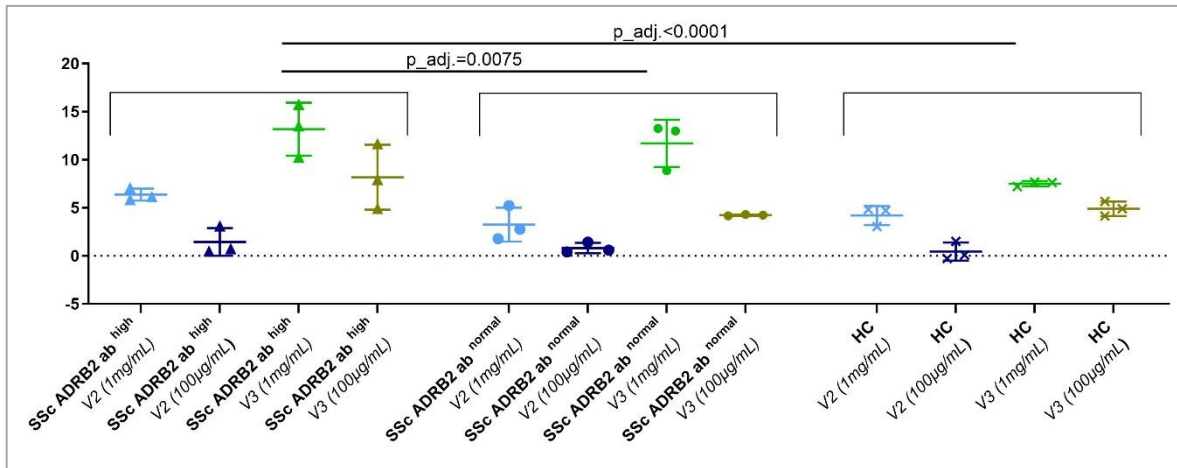
Nach Berücksichtigung aller drei Variablen bleibt im paarweisen Vergleich zwischen der Ko-Stimulierung mit SSc-IgG ADRB2 ab<sup>normal</sup> und SSc-IgG ADRB2 ab<sup>high</sup> ein Unterschied bestehen ( $p=0.00351$ ), der auf einen weiteren, nicht genauer definierbaren Einflussfaktor hindeutet.

Die zugehörigen Abbildungen der paarweisen Vergleiche sind im Anhang unter Punkt 7.4.1 zu finden.

**Tbl.10:** Paarweise Vergleiche abstrahierter Messwerte der TNF- $\alpha$  Sekretion durch PBMC (n=2, 2ng/mL, 6h) nach Ko-Stimulierung mit IgG (1 mg/mL bzw. 100  $\mu$ g/mL, 24h). Signifikante p-Werte sind fett markiert. Auswertung durch das Institut für Medizinische Biometrie und Statistik generiert. Statistische Auswertung mit Hilfe einer non-parametrischen Methode für faktorielles Design nach Noguchi K., et al.

Variable	p-Wert	p-Wert	p-Wert
	HC vs. SSc ADRB2 ab <sup>normal</sup>	HC vs. SSc ADRB2 ab <sup>high</sup>	SSc ADRB2 ab <sup>normal</sup> vs. SSc ADRB2 ab <sup>high</sup>
<b>Stimulierungsgruppen</b>	8.68x10 <sup>-1</sup>	<b>3.37x10<sup>-6</sup></b>	<b>2.50x10<sup>-3</sup></b>
<b>IgG-Konzentration</b>	<b>3.17x10<sup>-16</sup></b>	<b>3.05x10<sup>-10</sup></b>	<b>1.47x10<sup>-9</sup></b>
<b>Spender (V2, V3)</b>	<b>6.91x10<sup>-13</sup></b>	<b>5.72x10<sup>-24</sup></b>	<b>1.67x10<sup>-31</sup></b>
<b>Berücksichtigung aller Variablen</b>	1.14x10 <sup>-1</sup>	5.55x10 <sup>-2</sup>	<b>3.51x10<sup>-3</sup></b>

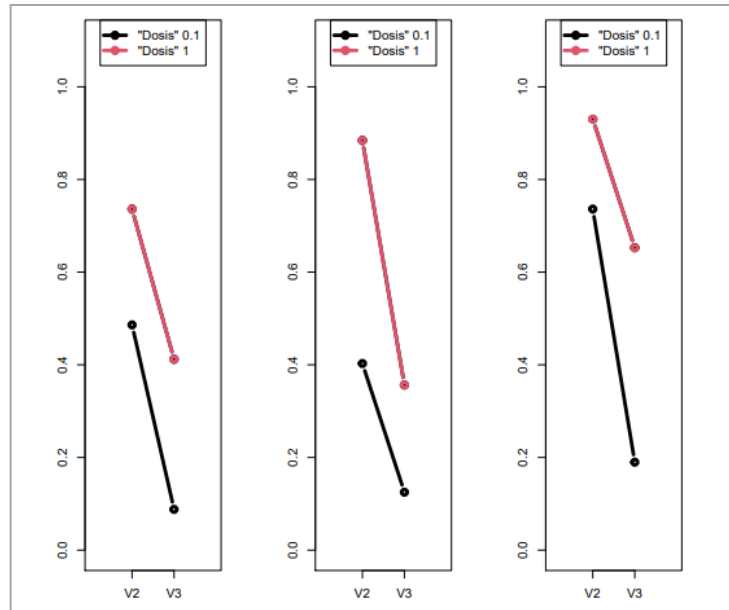
In Abb. 19 sind die auf Spender und IgG-Konzentrationen abstrahierten sowie zusätzlich nach Bonferroni für multiples Testen korrigierten Ergebnisse der Vergleiche zwischen der Stimulierung mit HC-IgG und SSc-IgG ADRB2 ab<sup>normal</sup> (p<sub>adj.</sub>=2.604), HC-IgG und SSc-IgG ADRB2 ab<sup>high</sup> (p<sub>adj.</sub>=0.00001011) sowie zwischen SSc-IgG ADRB2 ab<sup>normal</sup> und SSc-IgG ADRB2 ab<sup>high</sup> (p<sub>adj.</sub>=0.0075) zusammenfassend dargestellt. Es zeigt sich nach Ko-Stimulierung der PBMC mit SSc-IgG ADRB2 ab<sup>high</sup> eine höhere TNF- $\alpha$  Sekretion insbesondere im Vergleich zu HC-IgG, aber auch im Vergleich zu SSc-IgG ADRB2 ab<sup>normal</sup>. Zwischen der Ko-Stimulierung mit SSc-IgG ADRB2 ab<sup>normal</sup> und HC-IgG lässt sich kein Unterschied in der TNF- $\alpha$  Sekretion der PBMC feststellen.



**Abb.19:** Abstrahierte und für multiples Testen nach Bonferroni korrigierte Messwerte der TNF- $\alpha$  Sekretion geprimter PBMC (n=2, 2ng/mL, 6h) nach Ko-Stimulierung durch IgG (c=1 mg/mL und 100  $\mu$ g/mL) in Versuch 2 und 3. Darstellung der paarweisen Vergleiche (Tbl. 10). HC vs. SSc ADRB2 ab<sup>high</sup>: p<sub>adj.</sub> =0.00001011, SSc ADRB2 ab<sup>normal</sup> vs. SSc ADRB2 ab<sup>high</sup>: p<sub>adj.</sub> =0.0075, HC vs. SSc ADRB2 ab<sup>normal</sup>: p<sub>adj.</sub> =2.604. Eine Vergrößerung der Abbildung findet sich im Anhang (Punkt 7.4.4).

Der im Nachfolgenden dargestellte Gruppenvergleich zeigt bei Abstraktion auf IgG-Konzentration und PBMC-Spender ebenfalls einen Unterschied zwischen den Stimulierungsgruppen (p=0.0000195, s. Abb. 20 und Tbl. 11).

Wie bereits im paarweisen Vergleich zwischen SSc-IgG ADRB2 ab<sup>normal</sup> und SSc-IgG ADRB2 ab<sup>high</sup> beobachtet, blieb auch im Gruppenvergleich nach Berücksichtigung aller drei Variablen ein Unterschied bestehen (p=0.0067), der auf einen weiteren, nicht genauer definierbaren, Effekt oder Einflussfaktor hindeutet.



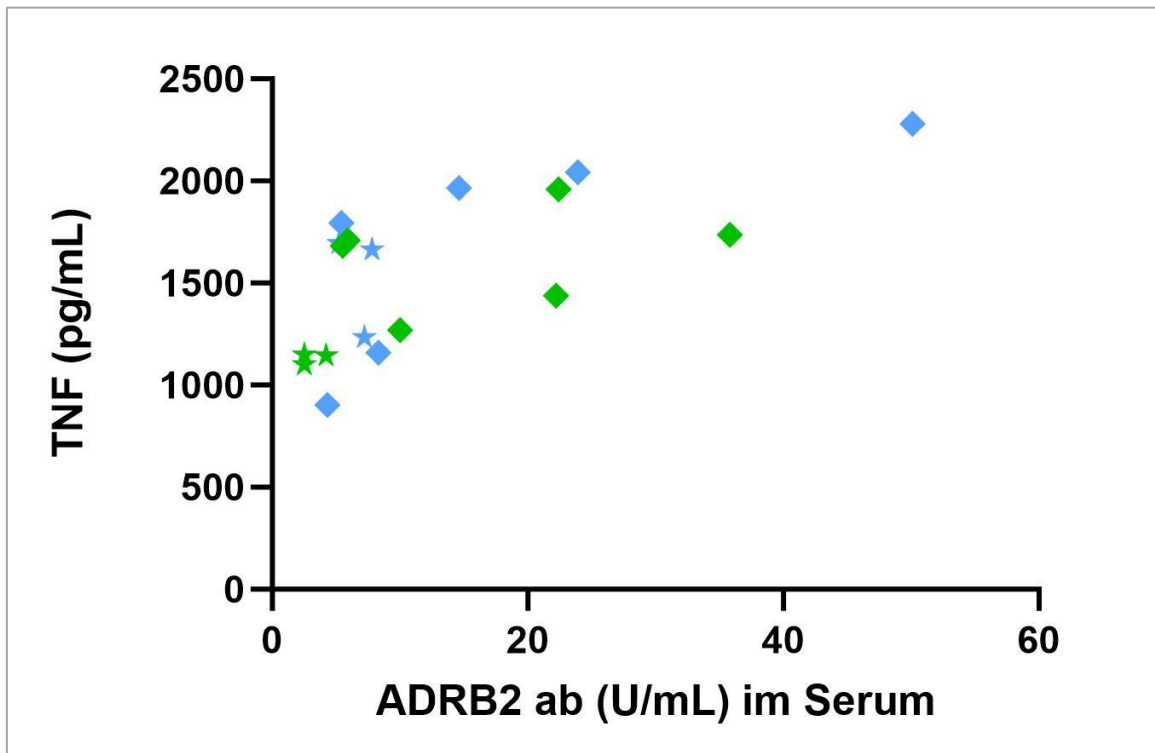
**Abb.20:** Gruppenvergleich abstrahierter Messwerte der TNF- $\alpha$  Sekretion durch PBMC (n=2, 2ng/mL, 6h) nach Ko-Stimulierung mit IgG (c=1 mg/mL und 100  $\mu$ g/mL, 24h) in Versuch 2 und 3. Gruppenunterschiede zwischen den Stimulierungsgruppen (HC (links), SSc ADRB2 ab<sup>normal</sup> (mittig), SSc ADRB2 ab<sup>high</sup> (rechts)), den IgG-Konzentrationen (Dosis) und den verschiedenen Versuchen (V2, V3). Alle  $p < 0.0001$  (s. Tbl. 11). Abbildung vom Institut für Medizinische Biometrie und Statistik erstellt. Statistische Berechnung mit Hilfe einer non-parametrischen Methode für faktorielles Design nach Noguchi K. et al.

**Tbl.11:** Gruppenvergleich abstrahierter Messwerte der TNF- $\alpha$  Sekretion durch PBMC (n=2, 2 ng/mL, 6h) nach Ko-Stimulierung mit IgG (1 mg/mL bzw. 100  $\mu$ g/mL, 24h). Signifikante p-Werte sind fett markiert. Auswertung durch das Institut für Medizinische Biometrie und Statistik generiert. Statistische Auswertung mit Hilfe einer non-parametrischen Methode für faktorielles Design nach Noguchi K. et al.

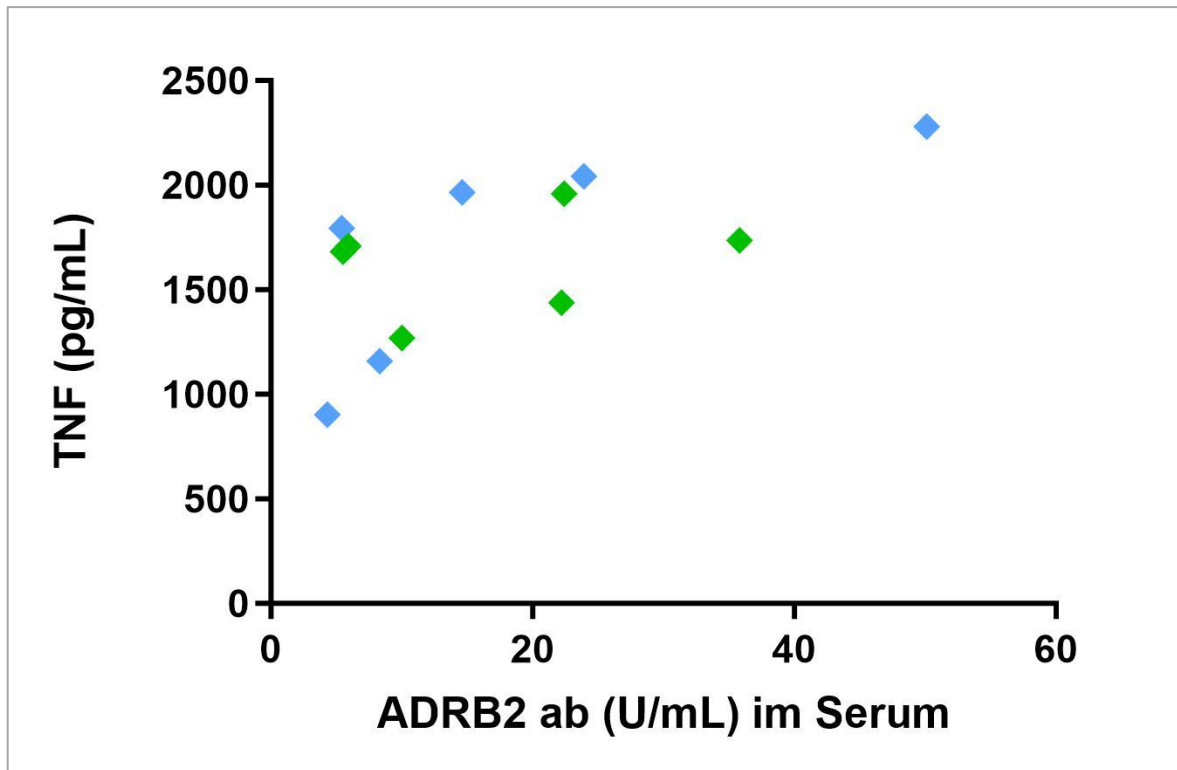
Variable	p-Wert
Stimulierungsgruppen	<b>1.95x10<sup>-5</sup></b>
IgG-Konzentration	<b>8.12x10<sup>-19</sup></b>
Spender (V2, V3)	<b>4.88x10<sup>-33</sup></b>
Berücksichtigung aller Variablen	<b>6.70x10<sup>-3</sup></b>

### 3.5.4 Die TNF- $\alpha$ Sekretion von mit IgG stimulierten PBMC korreliert positiv mit der ADRB2-Antikörperkonzentration im Serum

Zwischen der im Zellkulturüberstand der mit IgG stimulierten PBMC gemessenen TNF- $\alpha$  Konzentration und den im Serum der SSc-Kohorte und HC gemessenen ADRB2-Antikörperkonzentrationen ergab sich eine positive Korrelation ( $r=0.7176$ ,  $p=0.0008$ , Abb. 21). Diese Korrelation bestand in abgeschwächter Form auch bei alleiniger Betrachtung der SSc-Kohorte ( $r=0.6364$ ,  $p=0.0299$ , Abb. 22). Bei alleiniger Betrachtung der HC ließ sich keine Korrelation feststellen (HC:  $r=0.72$ ,  $p=0.12$ ).



**Abb. 21:** Korrelation der im Zellkulturüberstand sezernierten TNF- $\alpha$  Konzentration und der anti-ADRB2 Antikörperkonzentration im Serum von SSc Patienten ( $n=12$ ) und HC ( $n=6$ ). Farbige Zuordnung der Messwerte zu den PBMC-Spendern (V2: grün, V3: blau). Unterteilung in HC und SSc (HC: Sterne, SSc: Rechtecke). TNF- $\alpha$ -Werte basierend auf der Stimulierung mit 1 mg/mL IgG. Spearman correlation ( $r=0.7176$ ;  $p=0.0008$ ). MW der TNF- $\alpha$  Sekretion der LPS-Kontrollen  $<500$  pg/mL (nicht dargestellt).



**Abb.22:** Korrelation der im Zellkulturüberstand sezernierten TNF- $\alpha$  Konzentration und der ADRB2-Antikörperkonzentration im Serum der SSc Patienten (n=12). Farbige Zuordnung der Messwerte zu den PBMC-Spendern (V2: grün, V3: blau). TNF- $\alpha$ -Werte basierend auf der Stimulierung mit 1 mg/mL IgG. Spearman correlation ( $r=0.6364$ ;  $p=0.0299$ ). MW der TNF- $\alpha$  Sekretion der LPS-Kontrollen <500 pg/mL (nicht dargestellt).

Zwischen den ADRB2-Antikörpern im IgG und den im Zellkulturüberstand der PBMC gemessenen TNF- $\alpha$  Konzentrationen wurde keine Korrelation beobachtet ( $r=0.01$ ,  $p=0.97$ ). Zudem wurde keine Korrelation zwischen LPS-Gehalt der IgG und der TNF- $\alpha$  Sekretion festgestellt ( $r=0.52$ ,  $p=0.09$ ).

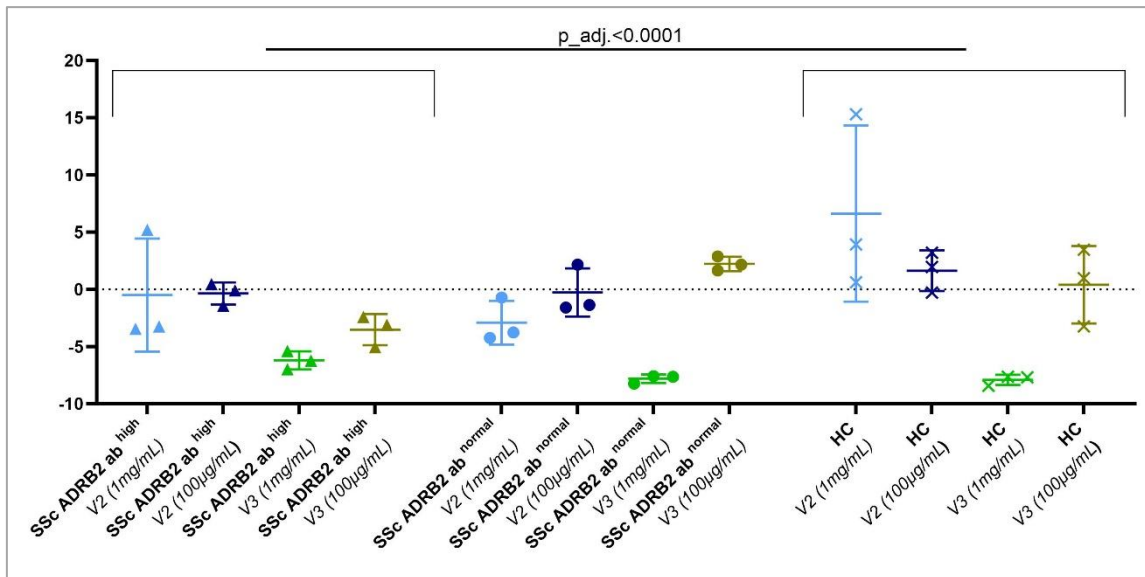
### 3.6 Möglicher Unterschied in der Freisetzung von IL-10 nach Ko-Stimulierung geprimter PBMC mit SSc-IgG ADRB2 ab<sup>high</sup>

Zur Auswertung möglicher Unterschiede in der IL-10 Sekretion wurden ebenfalls ausschließlich die PBMC-Spender von Versuch 2 und 3 herangezogen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte analog zu der vorangegangenen Auswertung der TNF- $\alpha$  Sekretion.

In Tbl. 12 sind analog zu Tbl. 10 hier für die Freisetzung von IL-10 die paarweisen Vergleiche von jeweils 2 Stimulierungsgruppen und die Signifikanz der Unterschiede für die einzelnen Vergleiche dargestellt. Im paarweisen Vergleich ergab sich ein Unterschied, der auf eine verminderte IL-10 Sekretion nach Ko-Stimulierung mit SSc ADRB2 ab<sup>high</sup> im Vergleich zu HC ( $p=0.00000337$ ) hinweist. Die zugehörigen Abbildungen der paarweisen Vergleiche sind im Anhang unter Punkt 7.4.2 zu finden.

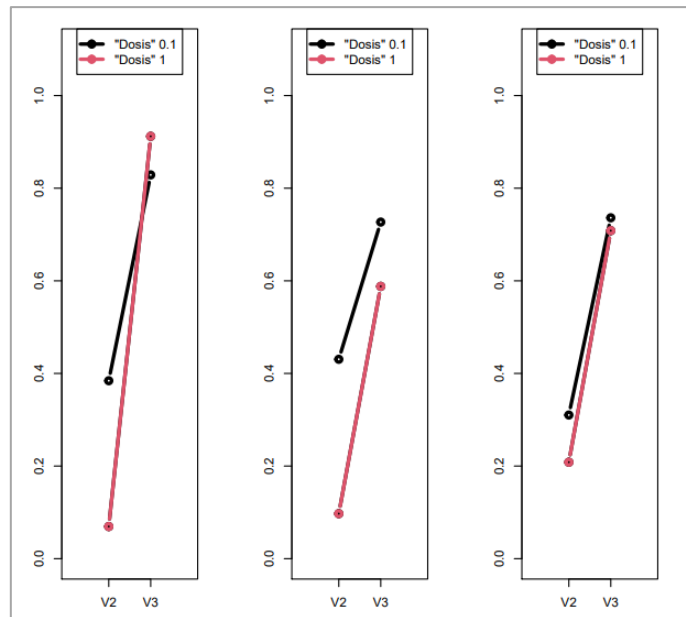
**Tbl.12:** Paarweise Vergleiche abstrahierter Messwerte der IL-10 Sekretion durch PBMC ( $n=2$ , 2 ng/mL, 6h) nach Ko-Stimulierung mit IgG (1 mg/mL bzw. 100  $\mu$ g/mL, 24h). Signifikante p-Werte sind fett markiert. Auswertung durch das Institut für Medizinische Biometrie und Statistik generiert. Statistische Auswertung mit Hilfe einer non-parametrischen Methode für faktorielles Design nach Noguchi K. et al.

Variable	<u>p-Wert</u>	<u>p-Wert</u>	<u>p-Wert</u>
	HC vs. SSc ADRB2 ab <sup>normal</sup>	HC vs. SSc ADRB2 ab <sup>high</sup>	SSc ADRB2 ab <sup>normal</sup> vs. SSc ADRB2 ab <sup>high</sup>
Stimulierungsgruppen	8.68x10 <sup>-1</sup>	<b>3.37x10<sup>-6</sup></b>	5.50x10 <sup>-1</sup>
IgG-Konzentration	<b>3.17x10<sup>-16</sup></b>	<b>3.05x10<sup>-10</sup></b>	<b>6.52x10<sup>-7</sup></b>
Spender (V2, V3)	<b>6.91x10<sup>-13</sup></b>	<b>5.72x10<sup>-24</sup></b>	<b>2.57x10<sup>-4</sup></b>
Berücksichtigung aller Variablen	1.14x10 <sup>-1</sup>	5.55x10 <sup>-2</sup>	9.66x10 <sup>-2</sup>



**Abb.23:** Abstrahierte und für multiples Testen nach Bonferroni korrigierte Messwerte der IL-10 Sekretion geprimter PBMC (n=2, 2 ng/mL, 6h) nach Ko-Stimulierung durch IgG (c=1 mg/mL und 100 µg/mL) in Versuch 2 und 3. Darstellung der paarweisen Vergleiche (Tbl. 12). HC vs. SSc ADRB2 ab<sup>high</sup>: p<sub>adj.</sub> =0.00001011, SSc ADRB2 ab<sup>normal</sup> vs. SSc ADRB2 ab<sup>high</sup>: p<sub>adj.</sub> =1.65, HC vs. SSc ADRB2 ab<sup>normal</sup>: p<sub>adj.</sub> =2.604. Eine Vergrößerung der Abbildung findet sich im Anhang (Punkt 7.4.5).

Im Gruppenvergleich nach Stimulierung mit IgG von HC und beiden SSc-Gruppen zeigte sich jedoch kein Unterschied zwischen den Stimulierungsgruppen (s. Tbl. 13). Aufgrund der im Vergleich zum paarweisen Test größeren n-Zahl bedingt dieses Ergebnis, dass der Hinweis auf einen möglichen Unterschied im paarweisen Vergleich zwischen Stimulierung mit SSc-IgG ADRB2 ab<sup>high</sup> im Vergleich zu HC-IgG nur als Tendenz gewertet werden sollte.



**Abb.24:** Gruppenvergleich abstrahierter Messwerte der IL-10 Sekretion von PBMC (n=2, 2 ng/mL, 6h) nach Ko-Stimulierung mit IgG (c=1 mg/mL und 100 µg/mL) in Versuch 2 und 3. Keine Gruppenunterschiede zwischen den Stimulierungsgruppen (HC (links), SSc ADRB2 ab<sup>normal</sup> (mittig), SSc ADRB2 ab<sup>high</sup> (rechts)). Gruppenunterschiede zwischen den IgG-Konzentrationen (Dosis) und den verschiedenen Versuchen (V2, V3, alle p<0.0001, s. Tbl. 13). Abbildung vom Institut für Medizinische Biometrie und Statistik generiert. Statistische Auswertung mit Hilfe einer non-parametrischen Methode für faktorielles Design nach Noguchi K. et al.

**Tbl.13:** Gruppenvergleich abstrahierter Messwerte der IL-10 Sekretion durch PBMC (n=2, 2 ng/mL, 6h) nach Ko-Stimulierung mit IgG (1 mg/mL bzw. 100 µg/mL, 24h). Signifikante p-Werte sind fett markiert. Auswertung durch das Institut für Medizinische Biometrie und Statistik generiert. Statistische Auswertung mit Hilfe einer non-parametrischen Methode für faktorielles Design nach Noguchi K., et al.

Variable	p-Wert
Stimulierungsgruppen	1.11x10 <sup>-1</sup>
IgG-Konzentration	<b>6.31x10<sup>-5</sup></b>
Spender (V2, V3)	<b>1.02x10<sup>-61</sup></b>
Berücksichtigung aller Variablen	9.14x10 <sup>-2</sup>

Zwischen dem im Zellkulturüberstand gemessenen IL-10 und den ADRB2 Antikörperkonzentrationen in Serum (r=0.11, p=0.65) oder IgG (r=-0.22, p=0.38) wurden keine Korrelationen beobachtet. Eine Korrelation zwischen LPS-Gehalt der IgG und IL-10 konnte ebenfalls nicht festgestellt werden (r=0.17, p=0.61).

## 4 Diskussion

Bei bestimmten chronisch-entzündlichen Autoimmunerkrankungen finden sich gegen unterschiedliche GPCR gerichtete IgG-Antikörper im peripheren Blut, welche z.T. mit Krankheitsmechanismen und/oder -manifestationen assoziiert sind. Das betrifft z.B. Antikörper gegen den AT1R, den CXCR3 oder den  $\beta$ 1-Adrenorezeptor<sup>62,65,80,81</sup>. Man nimmt an, dass Interaktionen zwischen von Immunzellen exprimierten GPCR und dagegen gerichteten IgG durch die Modulierung der GPCR-Signalübertragung u.a. die Zytokinfreisetzung verändern und so zu Krankheitsmechanismen bzw. -manifestationen beitragen. Daher wurde in dieser Arbeit anhand von *in vitro* Experimenten die Wirkung von via Affinitätschromatographie aus Seren von SSc-Patienten gewonnenem IgG auf die Zytokinsekretion einer Monozyten-ähnlichen humanen Zelllinie und mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut gesunder Spender (HC) ermittelt, im Vergleich mit IgG, das aus Seren von Patienten mit chronisch-entzündlichen Autoimmunerkrankungen (SSc, RZA, GPA) und HC isoliert wurde. Die Identifikation von Faktoren, die zur Entstehung der SSc beitragen können, ist für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze für die Behandlung der SSc von großer Relevanz<sup>101</sup>.

### 4.1 Limitationen durch verschiedene Datensätze, unterschiedliche Kontrollen (für die Zytokinsekretion von mit IgG stimulierten THP-1 Zellen) und verwendete Zellmodelle

Im Hinblick auf die in den Überstand sezernierten Moleküle von THP-1 Zellen findet sich sowohl die Auswertung des in dieser Arbeit durchgeführten Zytokin-Arrays als auch eine kombinierte Auswertung mit bereits erhobenen Daten<sup>9</sup>. Da sich durch die kombinierte Auswertung beider Arrays für die SSc-IgG Proben eine höhere Probenzahl ergibt, wurde diese Auswertung vorrangig betrachtet. Eine Heatmap wurde nur für die kombinierte Auswertung angefertigt. Zudem ist ein Vergleich zwischen SSc-IgG und RZA-IgG mit dem publizierten IVIG-Datensatz nur bei Zusammenschau beider Arrays möglich. Allerdings zeigte sich bei Zusammenführung beider Arrays, dass sich die Verteilung der Geschlechter bei HC und den SSc-Patienten veränderte ( $w=m$  für die SSc bei Zusammenführung der Proben vs.  $w>m$  bei HC und SSc bei dem in dieser Arbeit durchgeführten Array, s. auch Abschnitt 2.2.3). Zudem passten die RZA-Patienten bezüglich ihres Alters

nicht zu den anderen Gruppen. Der Grund hierfür liegt in dem späten Auftreten der Erkrankung, diese zeigt sich ab einem Alter von 50 Jahren<sup>14</sup>, während die SSc früher, z.B. bereits in den Dreißigern auftreten kann<sup>6</sup>. Die Verwendung der RZA-IgG diente als Krankheitskontrolle, d.h. zur Unterscheidung von Veränderungen der Zytokinsekretion beispielsweise durch Prozesse, die bei mehreren chronisch-entzündlichen Erkrankungen auftreten, von denen, die möglicherweise für die SSc spezifisch sein könnten. Die für RZA-IgG erhobenen Ergebnisse müssen jedoch mit Zurückhaltung betrachtet werden, da es sich bei einer Anzahl von n=4 um eine sehr niedrige Probenzahl handelt. Zudem muss bedacht werden, dass es sich bei Effekten, die nach Stimulierung mit RZA-IgG beobachtet wurden, um Alterseffekte handeln könnte, denn Alterung bewirkt per se Veränderungen in der Zytokinantwort<sup>50</sup>. Es muss darüber hinaus beachtet werden, dass die meisten Zytokine, für die eine veränderte Sekretion festgestellt wurde, nur vor der Adjustierung für multiples Testen signifikant verändert waren. Eine Überprüfung der verändert sezernierten Zytokine sollte unter Berücksichtigung einer erhöhten IgG-Spenderanzahl, welche außerdem im Alter und Geschlecht besser den Kontrollen bzw. dem bereits bekannten Verteilungsmuster bei Erkrankungen wie der SSc angepasst wurden, stattfinden.

IVIG sind Immunglobuline, welche aus dem Plasma einer Vielzahl von Spendern gewonnen und anschließend gepoolt werden<sup>98,99</sup>. Bei den Spendern handelt es sich um ‚gesunde‘ Spender<sup>98</sup>, es scheint aber diskutabel, ob die Überprüfung der Gesundheit der Spender zweifelsfrei möglich ist, oder ob doch möglicherweise unerkannte Erkrankungen eingeschlossen werden. Anders als im über Affinitätschromatographie aufgereinigten IgG sind im IVIG zusätzlich zum IgG, welches im Blut in großer Menge vorhanden ist<sup>52</sup>, auch andere Immunglobulin-Isotypen, insbesondere IgA, enthalten<sup>99</sup>. Dieser Unterschied in der Gewinnung und Zusammensetzung schwächt die Vergleichbarkeit. Hinzu kommt, dass in Bezug auf die IVIG keine Überprüfung einer Übereinstimmung des Altersmedians oder der Zusammensetzung der Geschlechterverteilung möglich ist und diesbezüglich entstandene Unterschiede nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden können. Dennoch bieten die IVIG eine Möglichkeit, eine Kontrolle zu schaffen, in der eine beachtliche Menge gesunder Spender eingeschlossen werden kann. Die Verwendung der HC-IgG erscheint auf Grund der Möglichkeit der Angleichung des Altersmedians und der Geschlechteranteile sowie der Verwendung der gleichen

Methode der Gewinnung wie die SSc-IgG als valide Methode, jedoch besteht hier nicht die Möglichkeit, eine so große Anzahl an Probanden einzuschließen, wie in der Verwendung der IVIG als Kontrolle gewährleistet wird.

Bei den THP-1 Zellen, welche für einen Teil der Versuche verwendet wurden, handelt es sich um eine humane akute monozytär-leukämische Zelllinie<sup>88</sup>, welche ihre monozytären Eigenschaften in Kultur für 14 Monate behält<sup>89</sup>. Diese Zeiträume wurden bei meinen Versuchen nicht überschritten, so dass von einer Beibehaltung der monozytären Eigenschaften sowie der Aktivität und Sensibilität ausgegangen wurde. Dies wurde jedoch nicht vor Durchführung der jeweiligen Versuche überprüft, sodass eine hierdurch zustande kommende Beeinträchtigung der mit diesen Zellen durchgeführten Versuche nicht ausgeschlossen werden kann. In folgenden Versuchen sollte auf standardisierte Protokolle zur Kultivierung der THP-1 Zellen zurückgegriffen werden<sup>102</sup>. Bei den THP-1 Zellen handelt es sich um eine Tumorzelllinie und es stellt sich die Frage, inwiefern sich die zu beobachtenden Effekte mit denen primärer, direkt von Probanden gewonnener monozytärer Zellen decken. Ein Unterschied zwischen THP-1 Zellen und PBMC, welche aus dem Blut von Probanden gewonnen werden, wurde z. B. in Bezug auf die IL-10 Sekretion nach LPS-Stimulierung beschrieben<sup>103</sup>. Während THP-1 Zellen in 24h kein IL-10 sezernierten, fand sich bei PBMC eine über die Zeit (24 h) ansteigende IL-10 Sekretion<sup>103</sup>. Murthy et al. konnten jedoch eine wie bei PBMC vorliegende, Fcγ-Rezeptor unabhängige, CCL18 und IL-8 Sekretion nach Stimulierung mit IgG zeigen, was die Eignung dieses Zellmodells unterstützt<sup>9</sup>. Deshalb wurden die THP-1 Zellen als ein Monozyten-Zellmodell ausgewählt.

In der Literatur wird eine durch Stimulierung mit SSc-IgG im Vergleich zu HC-IgG gesteigerte CCL18 Sekretion von THP-1 Zellen beschrieben<sup>9</sup>. Dieses Ergebnis wurde hier nicht reproduziert. Ein Grund dafür könnte sein, dass im Versuch von Murthy et al. von mehreren Spendern gepooltes HC-IgG verwendet wurde<sup>9,104</sup>, während hier, wie bei den SSc-IgG, die CCL18 Sekretion einzelner HC-IgG ermittelt wurde. Außerdem wurden in meinen Versuchen die anti-AT1R- bzw. anti-ETAR-IgG-Spiegel in den Proben nicht berücksichtigt, wobei eine Auswirkung dieser IgG auf die CCL18 Sekretion verschiedener Zellen (PBMC, HMEC-1) bereits bekannt ist<sup>67,68</sup>. Darüber hinaus gab es einen deutlichen Altersunterschied zwischen den SSc Patienten und den HC<sup>9,104</sup>. Die HC von Murthy et al. zeigten einen etwa um 30 Jahre verringerten Alters-Mittelwert im Vergleich zu den SSc Probanden, woraus

sich die Möglichkeit ergibt, dass es sich bei der erhöhten CCL18 Freisetzung auch um einen Alterseffekt handeln könnte. Im Zusammenhang damit wurde hier eine schwache positive Korrelation zwischen dem Alter und CCL18 beobachtet ( $r=0.4206$ ,  $p=0.0132$ ). Höhere Mengen von CCL18 im Plasma von älteren gesunden Kontrollen im Vergleich zu jüngeren wurden bereits beschrieben<sup>22</sup>. Dort wurden gesunde Kontrollen  $\leq 35$  Jahre mit gesunden Kontrollen  $\geq 60$  Jahre verglichen<sup>22</sup>. Meine schwach vorliegende Korrelation könnte daraus resultieren, dass die Altersmediane der Gruppen (SSc, HC und GPA) zwischen diesen Altersgrenzen liegen und ein starker Anstieg des CCL18 möglicherweise erst ab einem bestimmten Alter, beispielsweise ab 60 Jahren, stattfindet. Als Krankheitskontrollen verwendete ich alters-gematchte GPA-IgG und nicht-alters-gematchte RZA-IgG. Alters-Matching war für die RZA-Patienten aufgrund des späten Krankheitsbeginns nicht möglich. Dass CCL18 im Zusammenhang mit der SSc bereits mehrfach als suffizienter Biomarker beschrieben wurde<sup>20,21,49</sup>, legt nahe, dass der hier fehlende Unterschied in der CCL18 Sekretion nach Stimulierung mit SSc- und HC-IgG möglicherweise nicht der Realität entspricht. Es sollte erwogen werden, bei erneuten Versuchen möglicherweise ein anderes Zellmodell, beispielsweise eine andere monozytäre Zelllinie zu verwenden, um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen.

Des Weiteren zeigte sich insofern ein Unterschied zwischen meinen Versuchen und den Versuchen von Murthy et al.<sup>9</sup>, als dass die hier gemessenen Konzentrationen für CCL18 sowohl nach Stimulierung mit HC-IgG als auch mit SSc-IgG deutlich höher ausfielen. Das könnte vielleicht auf Unterschiede in der Reaktivität der THP-1 Zellen zurückzuführen sein.

Bei PBMC handelt es sich um mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut<sup>105</sup>. Die PBMC, welche für einen Teil der Versuche verwendet wurden, wurden aus dem Blut gesunder Spender isoliert. Mögliche Abweichungen zwischen den Spendern müssen daher z.B. durch eine statistische Anpassung berücksichtigt werden.

#### **4.2 Zytokinsekretionsmuster von THP-1 Zellen nach Stimulierung mit SSc-IgG, RZA-IgG und HC-IgG weisen Unterschiede und Ähnlichkeiten auf**

Anhand einer Principal Component Analyse ließ sich kein Clustering der IgG-Proben darstellen. Als mögliche Erklärung hierfür sollte zunächst die niedrige Probenanzahl bedacht werden, durch die die Heterogenität der Erkrankung nicht ausgeglichen wird, wie es eventuell bei einer größeren Kohorte der Fall wäre. Das fehlende Clustering der IgG-Proben und die niedrige Varianz von nur bis etwa 35%, die im Scree Plot in den ersten beiden Dimensionen eingefangen wird, sprechen im Umkehrschluss auch für variable Zytokinprofile, wie bereits für SSc-Patienten beschrieben wurde<sup>5,9</sup>. Dieses Bild ließ sich sowohl bei Betrachtung der Auswertung des in dieser Arbeit durchgeführten Arrays alleine als auch bei Berücksichtigung beider Arrays erkennen. Das individuelle Zytokinprofil steht in Einklang mit der heterogenen klinischen Manifestation der SSc, die beinahe jedes Organ betreffen kann<sup>1</sup>, sowie dem variablen Krankheitsverlauf, Überleben und Ansprechen auf Therapien<sup>2</sup>.

Nach Stimulierung von THP-1 Zellen mit SSc-IgG oder RZA-IgG im Vergleich zu IVIG wird deutlich, dass bestimmte Mediatoren nach Stimulierung sowohl mit SSc-IgG als auch mit RZA-IgG verändert sind. Ins Auge fallen vor allem ANG, PPBP, CX3CL1 und CCL4, welche mit einer hohen Signifikanz im Vulcano Plot weit außerhalb der Gruppe der anderen veränderten Mediatoren liegen und auch nach Adjustierung für multiples Testen signifikant bleiben (alle  $p_{adj} < 0.0001$ ). Da diese 4 Moleküle in beiden Gruppen vermehrt sezerniert werden, ist eine Rolle in krankheitsübergreifenden entzündlichen oder autoimmunen Prozessen denkbar. Gleiches gilt für TGFB3 und CCL22, welche bei SSc-IgG und RZA-IgG gegenüber IVIG nach Adjustierung ebenfalls erhöht waren (s. Tbl. 9).

Interessanterweise tritt in diesem Vergleich ebenfalls IGFBP4 als signifikant verändert auf, sowohl bei SSc-IgG als auch bei RZA-IgG gegenüber IVIG erhöht. Dieses Ergebnis steht in Kontrast zur verminderten Freisetzung von IGFBP4 durch THP1-Zellen nach Stimulierung mit SSc-IgG im Vergleich zu HC-IgG (s. Tbl. 7). Betrachtet man die Kontrollgruppen (HC-IgG vs. IVIG), so ergeben sich, wie bereits zuvor beschrieben, substantielle Unterschiede in der Anzahl und vermutlich auch der Qualität zwischen den IVIG-Präparationen und den selbst aus Serum aufgereinigten HC-IgG. Unter Berücksichtigung der vergleichbaren

Versuchsbedingungen im hier durchgeführten Zytokin-Array nach Stimulierung mit HC-IgG und SSc-IgG wird dieses Ergebnis im Hinblick auf IGFBP4 als wahrscheinlicher eingeschätzt. In aktuellen, nicht publizierten Daten (Korrespondenz Prof. Dr. Riemekasten, Dr. Hackel, Forschungslabor Rheumatologie und klinische Immunologie) führte die Stimulierung von monozytischen Zellen (U937) mit einem monoklonalen AT1R-Antikörper ebenfalls zu einer verminderten IGFBP4-Sekretion. Für die SSc wurden mehrfach Autoantikörper gegen den AT1R als bedeutsam beschrieben<sup>58,66-69</sup>. Insgesamt weisen die Ergebnisse meiner Arbeit und die o.g. unpublizierten Resultate auf einen Zusammenhang zwischen AT1R-Antikörpern und der verminderten IGFBP4-Sekretion von monozytären Zellen hin. Die AT1R-ab Konzentration wurde in den hier verwendeten IgG nicht bestimmt, sollte bei weiterführenden Versuchen jedoch berücksichtigt werden.

Nach Stimulierung mit SSc-IgG und RZA-IgG im jeweiligen Vergleich mit IVIG ergaben sich beim SSc-IgG 6 Mediatoren, welche für RZA-IgG nicht verändert waren. Auch für RZA-IgG konnten 5 veränderte Mediatoren identifiziert werden (s. Tbl. 9), die für die Erkrankung von Relevanz sein könnten, die aber aufgrund bereits zuvor genannter Einschränkungen nicht näher betrachtet werden. Im Vergleich mit IVIG wurden nach Stimulierung mit SSc-IgG FGF7, NTF4 und IGFBP1 vermehrt und CCL26, EGF und CSF1 vermindert sezerniert.

Bei FGF7/KGF handelt es sich um einen Wachstumsfaktor, bei dem davon ausgegangen wird, dass er an der Entstehung fibrotischer Störungen beteiligt ist<sup>106</sup>. Im Serum von Patienten mit SSc sowie bei von SSc-Patienten gewonnenen Haut-Fibroblasten wurden im Vergleich zu Gesunden erhöhte Mengen an FGF7 festgestellt<sup>106</sup>. Die erhöhten FGF7 Mengen bleiben auch nach mehrmaliger Passage der Fibroblasten in Zellkultur bestehen, was eher auf eine mögliche genetische Ursache als auf einen äußeren Einfluss hindeutet<sup>106</sup>. In meinem Versuch wurde durch die Stimulierung mit SSc-IgG eine erhöhte Sekretion von FGF7 durch monozytäre Zellen bewirkt, was zu den bei der SSc im Serum erhöhten FGF7 Werten passen würde.

NTF4 vermittelt Differenzierung und Überleben von Neuronen<sup>107</sup> und spielt eine wichtige Rolle im Langzeitüberleben von sensorischen Neuronen<sup>108</sup>. Weitere Untersuchungen sollten durchgeführt werden, um eine mögliche Rolle des NTF4 bei der SSc zu analysieren.

IGFBP1 wurde in Seren von Patienten mit idiopathischer pulmonaler Fibrose erhöht vorgefunden<sup>109</sup>. Die SSc-Patienten, mit deren IgG hier die Stimulierung der THP-1 Zellen erfolgte, wiesen zu ca. 85% eine Lungenfibrose auf, sodass der Gedanke naheliegt, dass IGFBP1 in der SSc-assoziierten pulmonalen Fibrose eine Rolle spielen könnte. Diese Vermutung muss jedoch durch weitere Versuche validiert werden.

Es wird vermutet, dass CCL26 in atopischen Erkrankungen zu einer Akkumulation von eosinophilen Granulozyten beitragen kann<sup>110</sup>. Da davon ausgegangen wird, dass die Entstehung der SSc u.a. durch Umweltfaktoren beeinflusst wird<sup>2</sup>, könnte über einen Zusammenhang der veränderten CCL26 Sekretion mit der Suszeptibilität von SSc-Patienten gegenüber bestimmten Umweltfaktoren spekuliert werden.

EGF spielt in Wachstum, Proliferation und Differenzierung verschiedener Zellen eine Rolle<sup>111</sup>. Anders als bei der SSc vielleicht erwartet werden könnte, wird es hier jedoch nach Stimulierung von THP-1 Zellen mit SSc-IgG im Vergleich mit IVIG vermindert sezerniert. Für Patienten mit SSc wurden Autoantikörper gegen die extrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors (EGFR) beschrieben<sup>112</sup>. Des Weiteren wurde beschrieben, dass IgG von Patienten mit SSc den EGFR aktivieren kann<sup>113</sup>. Eine Aktivierung des EGFR auf Fibroblasten von Patienten mit SSc durch EGF fiel deutlich geringer aus, als dies bei Gesunden der Fall war<sup>114</sup>. Ebenfalls geringer als bei Gesunden war die Expression des EGFR auf den Fibroblasten<sup>114</sup>. Die Veränderung im EGF/EGFR Signalweg<sup>114</sup> könnte möglicherweise durch eine niedrigere EGF-Sekretion bei der SSc begünstigt werden, die durch das Auftreten eines durch Autoantikörper verstärkten negativen Feedbackmechanismus moduliert würde. Das hier erzielte Ergebnis unterstützt diese Hypothese, da die Stimulierung mit SSc-IgG eine niedrigere EGF-Sekretion zur Folge hatte als die Stimulierung mit IVIG. Die niedrigere Expression des EGFR auf Fibroblasten von SSc-Patienten<sup>114</sup> könnte Folge einer Herunterregulation durch eine fehlende Aktivierung des Rezeptors durch EGF, welches möglicherweise bei der SSc vermindert sezerniert

wird, widerspiegeln. Hierbei handelt es sich jedoch um eine Spekulation, die durch weitere Versuche überprüft werden sollte.

CSF1 wird auch als M-CSF (Macrophage colony stimulating factor) bezeichnet und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Makrophagen, wo es vermutlich als Gegenspieler des Zytokins GM-CSF (Granulocyte macrophage colony stimulating factor) fungiert<sup>115</sup>. *In vitro* Versuche zeigten, dass M-CSF in Makrophagen eher die antiinflammatorische M2-Polarisierung begünstigt, während GM-CSF eher die proinflammatorische M1-Polarisierung fördert<sup>115</sup>. Meine Ergebnisse zeigen eine verminderte M-CSF Sekretion nach Stimulierung mit SSc-IgG im Vergleich zum IVIG. In diesem Fall ist zu vermuten, dass vermehrt GM-CSF wirkt und somit eine überwiegende M1-Polarisierung stattfindet, was zu dem in der Literatur beschriebenen proinflammatorischen Phänotyp von monozytären THP-1 Zellen nach Stimulierung mit SSc-IgG passt<sup>9</sup>. Speziell für die SSc wurde bislang meines Wissens nach kein Zusammenhang mit veränderten CSF1 bzw. M-CSF Mengen beschrieben. In Seren von Patienten mit rheumatoider Arthritis wurden jedoch erhöhte M-CSF Spiegel festgestellt<sup>116</sup>. Hinzu kommt, dass mit fortschreitendem Alter eine Verschiebung des M1/M2 Gleichgewichts in Richtung M1-Polarisierung beschrieben wurde<sup>115</sup>, was möglicherweise ein vermehrtes Vorliegen von GM-CSF implizieren und ein Hinweis darauf sein kann, dass das im Gegenzug niedriger vorliegende M-CSF Folge eines Alterseffekts ist. Dieser ist bei Verwendung der IVIG nicht auszuschließen, da hier kein Altersmedian und kein Altersbereich bekannt sind.

Nach Adjustierung blieben im Vergleich zwischen SSc-IgG und RZA-IgG mit IVIG insgesamt lediglich drei erhöhte Mediatoren mit einer Signifikanz bestehen. Bei SSc-IgG handelt es sich hierbei um BDNF und CCL15, bei RZA-IgG um CCL24. Erwähnenswert ist jedoch, dass diese Mediatoren vor Adjustierung auch bei der jeweils anderen IgG-Gruppe erhöht waren, weshalb die krankheitsspezifische Relevanz fraglich ist.

CCL15 wird auch als Makrophagen Entzündungsprotein 1 $\gamma$  (MIP-1 $\gamma$ ) bezeichnet und gehört somit einer Gruppe von Proteinen an, die eine Rolle in Auslösung und Modulation von Entzündungsreaktionen sowie der Regulation der Gewebshomöostase spielt<sup>117</sup>. MIP-1 Proteine fördern verschiedene Erkrankungen, wie beispielsweise rheumatoide Arthritis oder allergisches Asthma<sup>117</sup>. Ein

Zusammenhang mit der Pathogenese der SSc erscheint denkbar und sollte weiterverfolgt werden.

BDNF wird neben der Funktion als Mediator in der Neurogenese<sup>118</sup> eine immunologische Funktion zugesprochen; es steigert Proliferation und vermindert Apoptose von Lymphozyten<sup>119</sup>. Veränderte zirkulierende BDNF Spiegel wurden im Zusammenhang mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen beschrieben (z.B. mit SSc, rheumatoider Arthritis oder systemischem Lupus erythematoses)<sup>119</sup>. BDNF Serumspiegel waren in der SSc im Vergleich zu gesunden Kontrollen vermindert, insbesondere bei Betrachtung von Patienten mit diffuser SSc<sup>120</sup>. Dies steht im Gegensatz zu den hier nach Stimulierung mit SSc-IgG erhöhten BDNF Spiegel, weshalb dieses Ergebnis kritisch hinterfragt und die Rolle des BDNF in der SSc ggf. weiter überprüft werden sollte.

Die hier beschriebene Sekretion von Mediatoren ist die Folge der *in vitro* Stimulierung der THP-1 Zellen mit zirkulierenden IgG von Patienten mit SSc im Vergleich zu Kontrollen. Einige Ergebnisse weisen darauf hin, dass SSc-IgG spezifische Veränderungen in der Sekretion von Mediatoren durch Immunzellen bewirken können.

Es muss jedoch beachtet werden, dass ein Vergleich zwischen *in vitro* Experimenten und z.B. *ex vivo* Messungen von Zytokinen im Serum nicht uneingeschränkt möglich ist. So stellt z.B. die Stimulierungsdauer von 24 Stunden möglicherweise nicht die optimale Zeitspanne für alle im Array messbaren Mediatoren dar. Dennoch bietet sich aber ein Anhaltspunkt für die Betrachtung zellulärer Prozesse aus verschiedenen Blickwinkeln. So können die Ergebnisse aus den Volcano Plots mit Literaturdaten zu den Mediatoren verglichen werden, um deren Validität als Marker im Rahmen der SSc zu beurteilen. Die Verwendung variabler Stimulierungszeiten könnte hier weitere Erkenntnisse liefern. Eine Validierung der Ergebnisse könnte durch die Erhöhung der n-Zahl der IgG für die SSc und HC, jeweils abgestimmt für Alter und Geschlecht, bzw. durch die gezielte Blockierung einzelner Schritte von relevanten Signalkaskaden der GPCR gelingen.

#### **4.2.1 Erhöhte Sekretion von MIF und verminderte Sekretion von IGFBP4 nach Stimulierung von THP-1 Zellen mit SSc-IgG im Vergleich zu HC-IgG**

Im Vergleich der Stimulierung von THP-1 Zellen mit IgG von SSc-Patienten und HC ließ sich unter Verwendung der kombinierten Arrayergebnisse MIF als einziges Zytokin ausmachen, das sich unterscheidet. Im Vergleich mit HC-IgG wurde es nach Stimulierung mit SSc-IgG vermehrt sezerniert, was unterstreicht, dass MIF bei der SSc eine Rolle spielen könnte<sup>121–123</sup>. Das Ergebnis passt zu den Erkenntnissen von Kim et al., die eine erhöhte Menge an MIF im Serum von SSc-Patienten gefunden haben<sup>122</sup>. Da MIF u.a. von Monozyten sezerniert wird<sup>121</sup>, erscheint die Sekretion durch die THP-1 Zellen valide, denn es handelt sich um eine monozytäre Zelllinie<sup>88</sup>. Durch die Eigenschaft von MIF, die Apoptose dermalen Fibroblasten zu verringern, zusammen mit der Erkenntnis, dass dermale Fibroblasten, gewonnen von SSc-Patienten, eine vermehrte Menge an MIF aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass MIF bei der SSc zur Fibrose der Haut beiträgt<sup>122</sup>. MIF bindet mit hoher Affinität an den Rezeptor CD74<sup>124</sup>, was u.a. zur Aktivierung von NF-κB führt und das Zellüberleben fördert<sup>125</sup>. Außerdem führt die Aktivierung des CD74 u.a. zum Überleben und zur Zellteilung von B-Zellen<sup>125</sup>, was bei der SSc die (Auto-)Antikörperproduktion beeinflussen könnte. Bei Spondyloarthritis-Patienten wurde im Serum im Vergleich zu HC eine Erhöhung von anti-CD74 IgG und IgA festgestellt<sup>126</sup>. Ob dies bei Patienten mit SSc ebenfalls der Fall ist, sollte überprüft werden, denn die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen für eine erhöhte MIF-Sekretion durch Monozyten nach Interaktionen mit IgG, was die Möglichkeit birgt, dass auch CD74 oder Autoantikörper gegen CD74 involviert sein könnten. Darüber hinaus liegt MIF vermehrt in Geweben vor, die umweltexponiert sind und könnte daher eine Rolle in der Wirtsantwort auf Infektionen spielen<sup>121</sup>. Da Umweltfaktoren als Faktor in der Pathogenese der SSc angesehen werden<sup>2</sup>, ließe sich damit ebenfalls über eine relevante Rolle von MIF spekulieren. Monozyten tragen durch Freisetzung profibrotischer Faktoren und folgender Aktivierung weiterer Monozyten sowie Fibroblasten bei der SSc zur Gewebsfibrose bei<sup>127</sup>. Es wird davon ausgegangen, dass Monozyten bei SSc-Patienten eher in einem profibrotischen Aktivierungsstatus vorliegen, als es bei Gesunden der Fall ist<sup>127</sup>, was ebenfalls zu der erhöhten MIF-Sekretion passt. Es muss jedoch beachtet werden, dass sich auch im Vergleich von RZA- und HC-IgG eine erhöhte MIF-Sekretion feststellen ließ, was für eine mögliche generelle Beteiligung des Zytokins an chronisch-entzündlichen Prozessen sprechen

könnte. Dies wird dadurch gestützt, dass auch im Serum von Patienten mit weiteren chronisch-entzündlichen Erkrankungen (Granulomatose mit Polyangiitis, Mikroskopische Polyangiitis) im Vergleich zu HC erhöhte MIF-Titer gefunden wurden<sup>128</sup>.

Der Vergleich zwischen SSc-IgG und HC-IgG des in dieser Arbeit durchgeführten Arrays (einzelne Auswertung) zeigt, dass die Stimulierung mit SSc-IgG zu einer erniedrigten Sekretion von IGFBP4 durch THP-1 Zellen führt. Die verminderte Sekretion von IGFBP4 durch monozytäre Zellen nach der Stimulierung mit SSc-IgG passt zu einer verminderten IGFBP4 mRNA Expression in pulmonalen Fibroblasten von Patienten mit SSc-assoziiierter pulmonaler Fibrose<sup>129</sup>. Hinzu kommt, dass IGFBP4 eine antifibrotische Wirkung zugesprochen wird<sup>129</sup> und ein verringertes Vorliegen somit die Fibrose als eines der pathogenetischen Hauptcharakteristika der SSc befördern könnte. Das Ergebnis unterstützt die Vermutung, dass eine Dysbalance vom antifibrotischen IGFBP4 und den profibrotischen IGFBP3 und 5 bei der SSc Teil der Pathogenese der Fibrose sein könnte<sup>129</sup>. Außerdem hemmt IGFBP4 die Wirkung von TGF- $\beta$ <sup>129</sup>, dessen Serumspiegel wiederum mit denen des MIF korrelieren<sup>122</sup>. Warum sich nach der Kombination der beiden Arrays die verminderte Menge an IGFBP4 nicht wiederfindet, bleibt aufzuklären (s. auch Abschnitt 4.2). Die Erhöhung der Anzahl an IgG-Proben verbessert in der Regel die Qualität der Aussage. Daher ist die Beobachtung, dass MIF eine Signifikanz erlangt, wenn beide Arrays kombiniert ausgewertet werden, nachvollziehbar. Für IGFBP4 zeigt sich nach der kombinierten Auswertung der Arrays keine statistische Signifikanz mehr. Einfluss hierauf könnte die Tatsache haben, dass die Vergleichbarkeit der Gruppen durch das Kombinieren der Arrays, beispielsweise durch die dann vorliegende, nicht mehr übereinstimmende Verteilung der Geschlechter verändert ist. Es muss in Betracht gezogen werden, dass die Signifikanz bei geringer Probenanzahl auch zufällig zustande gekommen sein könnte. Da die veränderten Werte für MIF und IGFBP4 in der Literatur beschriebene pathogenetische Mechanismen bei der SSc reflektieren könnten, sollte die Anzahl an IgG-Proben in dem Zytokinfreisetzungsversuch erhöht und untersucht werden, ob bestimmte GPCR-Antikörper mit der veränderten Freisetzung von MIF oder IGFBP4 durch Immunzellen in Verbindung gebracht werden können.

Die jeweils erhöhte Menge von sechs bzw. sieben freigesetzten Zytokinen (einzelne Auswertung, s. Tbl. 7) nach der Stimulierung von THP-1 Zellen mit RZA-IgG sowohl

im Vergleich zu SSc-IgG als auch zu HC-IgG lässt sich am ehesten durch den deutlich erhöhten Altersmedian der RZA erklären. So ist z.B. bekannt, dass IL-6 mit dem Alter ansteigt<sup>48</sup>. Vermutlich spiegelt sich dies auch in *in vitro* Experimenten unter Verwendung von IgG älterer Spender wider. Ähnliches trifft vermutlich zudem für die erhöhte Menge an IL-10 zu<sup>23</sup>, welche nur in der kombinierten Auswertung der Zytokin-Arrays nach Stimulierung von THP-1 Zellen mit RZA-IgG im Vergleich zu SSc-IgG gefunden wurde. Allerdings wird berichtet, dass bei der SSc ab einer Erkrankungsdauer von 10 Jahren auch eine erhöhte Menge an zirkulierendem IL-10 nachgewiesen wurde<sup>5</sup>. In der kombinierten Auswertung der Zytokin-Arrays findet sich darüber hinaus eine erhöhte Menge an IL-7 nach Stimulierung mit RZA-IgG im Vergleich zu SSc-IgG. Für IL-7 ist bekannt, dass es im Serum von Patienten mit SSc im Vergleich zu Gesunden vermindert vorliegt<sup>47</sup>. Hierbei könnte es sich tatsächlich um einen Effekt der SSc-IgG handeln und diese mögliche Verbindung zwischen IL-7 und IgG bei der SSc sollte untersucht werden.

#### **4.2.2 Die Mehrzahl der nach Stimulierung von THP-1 Zellen mit SSc- und RZA-IgG im Vergleich zu IVIG erhöhten Mediatoren gehören dem Signalweg ‚durch Chemokin- und Zytokinsignalwege vermittelte Entzündung‘ an**

Im Serum bzw. Plasma von SSc-Patienten sind verschiedene proinflammatorische Zytokine erhöht (z.B. IL-1, IL-12, TNF- $\alpha$ )<sup>34</sup>. Zytokinspiegel sind bei der SSc z.T. mit klinischen Manifestationen assoziiert, beispielsweise findet sich erhöhtes IL-6 bei SSc-Patienten mit ILD<sup>35</sup>. Sowohl Murthy et al. als auch Günther et al. beschrieben proinflammatorische Effekte im Sinne einer Erhöhung der Zytokine CCL18 und IL-8 nach Stimulierung von THP-1 Zellen bzw. PBMC mit SSc-IgG<sup>9,67</sup>. Die meisten nach Stimulierung mit SSc- bzw. RZA-IgG im Vergleich zu IVIG erhöhten Mediatoren gehören dem Signalweg ‚durch Chemokin- und Zytokinsignalwege vermittelte Entzündung‘ an. Hierbei waren weder CCL18 noch IL-8 erhöht (dies wird in Abschnitt 4.1 diskutiert). Dennoch unterstützt die Identifizierung dieses Signalweges mit Hilfe des ‚Panther analysis tools‘ aufbauend auf den hier gefundenen proinflammatorischen Zytokinen die Annahme einer relevanten Beteiligung proinflammatorischer Prozesse an der Pathogenese der SSc bzw. der RZA.

#### 4.3 Erhöhte Spiegel an zirkulierenden anti-ADRB2 IgG begünstigen die proinflammatorische Zytokinantwort humaner Immunzellen

Wie experimentell bestimmt (s. Abschnitt 3.1), enthielten die von gesunden Probanden und Patienten aufgereinigten IgG wenig bis gar kein nachweisbares LPS. Entsprechend ergab sich zwischen den LPS-Messwerten und den sezernierten Zytokinmengen in keinem Fall eine Korrelation, was unterstreicht, dass die Effekte mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht durch den Endotoxingehalt der IgG beeinflusst wurden.

Die Versuche beinhalten unterschiedliche Dosierungen des IgG (1 mg/mL und 100 µg/mL) und im Hinblick auf das Geschlecht unterschiedliche Spender von PBMC. Um diese Unterschiede zu berücksichtigen, wurde ein bestimmtes statistisches Verfahren mit Abstraktion auf die Spender und die IgG-Dosen verwendet (s. Abschnitt 2.11). Im jeweils paarweisen Vergleich der drei Gruppen (HC, SSc ADRB2 ab<sup>high</sup>, SSc ADRB2 ab<sup>normal</sup>, s. Tbl. 10) wurden statistisch signifikante Unterschiede in der TNF-α Freisetzung festgestellt. Es ergab sich, dass SSc ADRB2 ab<sup>high</sup> IgG eine höhere TNF-α Sekretion von mononukleären Immunzellen hervorruft als SSc ADRB2 ab<sup>normal</sup> IgG und HC-IgG. Dieser Unterschied zeigte sich auch im Gruppenvergleich ( $p=0.0000195$ , s. Tbl. 11). Aufgrund der im Vergleich zum paarweisen Test größeren n-Zahl im Gruppenvergleich kann man von einer verbesserten statistischen Aussagekraft ausgehen. Im Gruppenvergleich kann man jedoch anders als im paarweisen Vergleich keine Aussage über die Richtung der Unterschiede treffen. Dieses Ergebnis passt zu der positiven Korrelation zwischen sezerniertem TNF-α und ADRB2 ab Titer im Serum aller Probanden ( $r=0.72$ ;  $p<0.001$ , s. Abb. 21).

Die Zugehörigkeit der SSc-IgG zu den Stimulierungsgruppen (ADRB2 ab<sup>high</sup> oder ADRB2 ab<sup>normal</sup>) wurde anhand der im Serum gemessenen ADRB2-Antikörperkonzentrationen in Anlehnung an die Versuche von Hartwig et al.<sup>83</sup> festgelegt. Bei Betrachtung der SSc Probanden ließ sich eine Korrelation zwischen den im Serum und im IgG gemessenen ADRB2-Antikörpern feststellen ( $r=0.6374$ ,  $p=0.0221$ , s. Abb. 17). Die schwach positive Korrelation zwischen im Serum und im IgG gemessenen ADRB1-Antikörpern ( $r=0.53$ ) zeigte mit einem p-Wert von 0.07 bei der SSc nur eine Tendenz. Bezogen auf die HC war für beide Antikörper keine Korrelation zu ermitteln.

Hartwig et al.<sup>83</sup> beschreiben, dass IgG von Patienten mit myalgischer Enzephalomyelitis/chronischem Fatigue-Syndrom (ME/CFS) und hohen Serumkonzentrationen an anti-ADRB2 Antikörpern (Median 19 Units/mL) bei simultaner Stimulierung von Vollblut mit LPS und IgG (18h) eine weniger starke Suppression der TNF- $\alpha$  Freisetzung hervorrief als IgG von Patienten mit normalen Serumkonzentrationen an anti-ADRB2 Antikörpern (Median 8 Units/mL) oder IgG von HC. In meinem Versuch zeigte sich nach Priming mit LPS und Ko-Stimulierung mit SSc ADRB2 ab<sup>high</sup> IgG im Vergleich zu SSc ADRB2 ab<sup>normal</sup> IgG und HC-IgG die höchste TNF- $\alpha$  Sekretion (s. Abb. 19). Daraus ergibt sich trotz bestimmter Unterschiede im Versuchsansatz ein ähnliches Ergebnis, d.h. eine erhöhte Menge an anti-ADRB2-IgG verstärkt die proinflammatorische Zytokinantwort von Monozyten aus dem peripheren Blut bei ME/CFS bzw. der SSc.

Im Allgemeinen führt die Aktivierung des ADRB2 durch Noradrenalin/Norepinephrin unter Nutzung des Signalweges über Adenylatzyklase, cAMP und Protein Kinase A zu metabolischen, neuroendokrinen und immunologischen Prozessen, wie der Veränderung der Herzfrequenz, Modulierung der Herzkontraktilität, T-Zell Proliferation und Zytokinsekretion<sup>10</sup>. Jedoch ist auch die Signaltransduktion über ein inhibitorisches G-Protein (Gi) mit nachfolgender Reduktion von cAMP möglich<sup>130</sup>. Norepinephrin/Noradrenalin ist ein Ligand des ADRB2, welcher in humanen (von Monozyten stammenden) Makrophagen die LPS-induzierte TNF- $\alpha$  Sekretion über Blockade von NF- $\kappa$ B durch  $\beta$ -Arrestin unterdrückt<sup>131–133</sup>. Darüber hinaus werden weitere proinflammatorische Zytokine wie IL-6 und IL-12 supprimiert und die akute IL-10 Sekretion gefördert<sup>54</sup>. Dies wandelt den zunächst proinflammatorischen Signalweg in einen antiinflammatorischen Signalweg um<sup>54</sup>. In der Tat zeigten Hartwig et al., dass die Stimulierung mit HC-IgG die Rekrutierung von  $\beta$ -Arrestin sowie die Produktion von cAMP in ADRB2-Reporterzelllinien bewirkt<sup>83</sup>, was in diesem Fall für eine eher untergeordnete Rolle der Signaltransduktion über Gi spricht.

Bei hoher physiologischer oder chronischer Aktivierung des ADRB2 wird statt des o.g. antiinflammatorisch wirkenden Signalwegs der MAPK-Signalweg benutzt, wodurch eine Förderung von Inflammation und zellulärer Immunität zu erwarten ist<sup>78</sup>. MAPK spielen eine wichtige Rolle in den Signalwegen, die Zelldifferenzierung, Zellproliferation, Zelltod und Embryogenese kontrollieren<sup>79</sup>. Sie können in Abwesenheit regulatorischer Untereinheiten durch Phosphorylierung aktiviert

werden, erhalten Informationen aus anderen Signalwegen und sind in der Lage, Signale zu amplifizieren<sup>79</sup>. Das MAPK Modul ist ein System aus Kinasen, das während der Evolution gut konserviert wurde und die Aufrechterhaltung von ansonsten kurzlebigen Signalprozessen ermöglicht<sup>52</sup>. Das Protein Ras aktiviert die MAPKKK, die auch als Raf bezeichnet wird, welche wiederum die MAPKK/MEK aktiviert<sup>52</sup>. Diese aktiviert die MAPK, oder auch Erk genannt, was zur Phosphorylierung weiterer Proteine und Transkriptionsregulatoren im Kern führt<sup>52</sup>. Hieraus resultieren vielschichtige Veränderungen in der Zelle, die durch eine geänderte Proteinaktivität und eine geänderte Genexpression entstehen<sup>52</sup>. Am Herzen wurde bereits gezeigt, dass eine chronische Aktivierung von  $\beta$ -Adrenorezeptoren eine proinflammatorische Reaktion mit einer u.a. erhöhten TNF- $\alpha$  Sekretion hervorruft<sup>134</sup>.

In der Studie zu ME/CFS ist aufgrund der Reduktion des proinflammatorischen TNF- $\alpha$  sowie der Steigerung des antiinflammatorischen IL-10 jeweils für die Stimulierungsgruppen HC-IgG und CFS AAB<sup>normal</sup> (vergleichbare ADRB2 ab Werte zu meiner SSc ADRB2 ab<sup>normal</sup> Stimulierungsgruppe) eine Aktivierung von ADRB2 über den antiinflammatorisch wirkenden, gängigen Signalweg naheliegend<sup>83</sup>. Dies wird durch eine erhöhte ADRB2-abhängige cAMP-Produktion in eben diesen Gruppen bekräftigt<sup>83</sup>. Bei Betrachtung des gängigen, antiinflammatorisch wirkenden Signalweges würde man von einer TNF- $\alpha$  Suppression bei ADRB2-Aktivierung ausgehen. Die hier beobachtete erhöhte Sekretion von TNF- $\alpha$  könnte für einen Wechsel des Signalweges zum MAPK Signalweg sprechen. Dies wird möglicherweise durch den gewählten Versuchsansatz gefördert [Priming mit LPS (6h) vor der Ko-Stimulierung mit IgG im Sinne einer chronischen Aktivierung]. Bereits die Ko-Stimulierung mit SSc-IgG ADRB2<sup>high</sup> in der Konzentration von 100  $\mu$ g/mL IgG führt zu einer erhöhten Sekretion von TNF- $\alpha$  durch PBMC. Das könnte ein Indiz für einen Wechsel zum MAPK-Signalweg sein, der bei erhöhter Menge von SSc-IgG ADRB2<sup>high</sup> (1 mg/ml) noch stärker ausgeprägt ist. Auch die in meinen Versuchen festgestellte positive Korrelation zwischen sezerniertem TNF- $\alpha$  und ADRB2 ab im Serum der Probanden legt den Wechsel des Signalweges nahe, sofern von einer agonistischen Wirkung der IgG ausgegangen wird.

Im Hinblick auf die Wirkung kann man von einem agonistischen Effekt von ADRB2-Antikörpern ausgehen. Ebenfalls könnte eine antagonistische Wirkung der IgG am ADRB2 erwogen werden, dies erscheint aber bei Betrachtung der Literatur und im

Gegensatz zum Signalwegwechsel des ADRB2 eher unwahrscheinlich, denn Hartwig et al. konnten in ihren Versuchen bereits eine agonistische Wirkung von ADRB2-IgG bei Gesunden nachweisen, die bei Patienten mit ME/CFS abgeschwächt ist<sup>83</sup>. Darüber hinaus wurden agonistische ADRB2-IgG beim Offenwinkelglaukom beschrieben<sup>82</sup>. Im Allgemeinen sind nach aktuellem Stand die meisten Autoantikörper Agonisten und aktivieren GPCR<sup>57</sup>. Für die SSc wurden dementsprechend agonistische IgG gegen den AT1R und ETAR gefunden<sup>58</sup>.

Zur Überprüfung der Hypothesen wäre eine Umkehr der gezeigten Effekte bspw. durch eine ADRB2 Rezeptorblockade sowie eine gezielte Untersuchung des MAPK Signalweges, z.B. mit Hilfe eines Immunoblottings oder spezifischer Blocker einzelner Bestandteile des Signalweges, sinnvoll. Leider konnte auf Grund eingeschränkter Verfügbarkeit geeigneter Probanden keine vollständige Alters- und Geschlechtsangleichung der Probanden erfolgen. In der Literatur wurden keine Unterschiede der TNF- $\alpha$  Plasmaspiegel in Bezug auf Alter oder Geschlecht festgestellt<sup>5</sup>, was die Hypothese unterstützt, dass die Unterschiede in der TNF- $\alpha$  Sekretion hier auf die verschiedenen hohen Titer der anti-ADRB2 Antikörper zurückzuführen sind. Unter Berücksichtigung der Versuche von Hartwig et al. fiel die Wahl der SSc-Patienten für die IgG-Anreicherung in meiner Arbeit auf solche mit sogenannter „Fatigue“. Es handelte sich hierbei jedoch um die reine Beurteilung des ärztlichen Behandlers und entsprechende Fragebögen wurden nicht ausgefüllt. Aus diesem Grund ist für dieses Ergebnis die Fatigue als Einflussfaktor nur als hintergründig und mit Vorsicht zu betrachten. Da in der Studie von Hartwig et al. Patienten mit ME/CFS untersucht worden sind, könnte sich hier ein Zusammenhang ergeben, der in weiteren Studien berücksichtigt werden sollte.

In der Auswertung des paarweisen Vergleiches der TNF- $\alpha$ -Sekretion von SSc ADRB2 ab<sup>normal</sup> und SSc ADRB2 ab<sup>high</sup> sowie im zugehörigen Gruppenvergleich verblieb auch nach Abstraktion aller Variablen ein signifikanter Unterschied ( $p=0.0035$  im paarweisen Vergleich bzw.  $p=0.0067$  im Gruppenvergleich). Dieser war folglich auf keinen der ausgewählten experimentellen Parameter (Spender, IgG-Konzentration, Stimulierungsgruppen) zurückzuführen. Es handelt sich also möglicherweise um einen Unterschied, der durch eine Einflussgröße zustande gekommen ist, die nicht gemessen wurde. Dies bedeutet, dass auch andere beobachtete Effekte durch eine unbekannte Variable zustande gekommen sein könnten und in diesem Fall der Unterschied der Stimulierungsgruppen SSc ADRB2

ab<sup>normal</sup> und SSc ADRB2 ab<sup>high</sup> sowie der Gruppenunterschied falsch positiv wären. Beispielsweise könnte der Effekt durch das unvollständige Geschlechts- und Alters-Matching der Probanden zustande kommen. Bei der Auswahl der Probanden wurde vorrangig auf Konzentration von ADRB2-Antikörpern im Serum geachtet, um diese den Gruppen optimal zuordnen zu können, weshalb in den Gruppen Unterschiede bestehen (bspw. in Bezug auf Alter, Geschlechtsverteilung oder Krankheitsdauer der Probanden, s. auch Abschnitt 2.2.2, klinische Charakterisierung). Zudem handelt es sich in diesem Versuch um eine kleine Stichprobengröße (n=6 pro Stimulierungsgruppe), sodass möglicherweise nicht erfasste Unterschiede nicht vollständig ausgeglichen werden können. Durch die kleine Stichprobengröße könnte es sich bei dem nicht näher bezeichneten Behandlungseffekt auch um eine falsch positive Signifikanz handeln. Zusätzlich wurden die Versuche an unterschiedlichen Tagen durchgeführt, was trotz gleicher Versuchsdurchführung als Ursache für die Restsignifikanz nicht ausgeschlossen werden kann. Versuche mit größeren Stichproben sind notwendig, um diesen verbliebenen Faktor ggf. eliminieren zu können.

Zur Überprüfung des Ergebnisses und zum Ausschluss weiterer Variablen sollte daher eine erneute Studie mit einer größeren Kohorte durchgeführt werden. Die anderen paarweisen Vergleiche der TNF- $\alpha$ -Sekretion sowie die Vergleiche der IL-10 Sekretion sind von dem genannten Effekt nicht betroffen.

Nach Stimulierung der PBMC mit LPS und Ko-Stimulierung mit IgG zeigte sich im Gruppenvergleich der Stimulierungsgruppen (HC, SSc ADRB2 ab<sup>high</sup>, SSc ADRB2 ab<sup>normal</sup>) kein Unterschied in der IL-10 Sekretion. Lediglich im paarweisen Vergleich wurde ein Unterschied zwischen den Stimulierungsgruppen HC und SSc ADRB2 ab<sup>high</sup> beobachtet. Der Gruppenvergleich berücksichtigt eine höhere Anzahl an Ergebnissen und ist somit als statistisch aussagekräftiger anzusehen. Da hier kein Unterschied feststellbar war, ist die im paarweisen Vergleich gezeigte gesteigerte IL-10 Sekretion nach Stimulierung mit HC IgG im Vergleich zu SSc ADRB2 ab<sup>high</sup> unter Vorbehalt zu betrachten. Diese Beobachtung passt allerdings zu den Versuchen von Hartwig et al., wo eine Steigerung der IL-10 Sekretion in der HC- sowie der Patientengruppe mit normalen ADRB2-Antikörper Konzentrationen gegenüber der Kontrolle beobachtet wurde<sup>83</sup>. Als Gründe für die verschiedenen Ergebnisse kommen wieder die oben genannten Unterschiede im Versuchsaufbau, insbesondere das hier verwendete Priming in Betracht. Die IL-10 Sekretion nach

Ko-Stimulierung der geprimten PBMC mit IgG in meinen Versuchen war höher (etwa verdoppelt) im Vergleich zu Hartwig et al.<sup>83</sup>. Dies steht im Gegensatz zu der im vorherigen Abschnitt aufgegriffenen Hypothese des Signalweg-Wechsels zu einem proinflammatorischen Weg. Jedoch ist auch eine partielle Beteiligung beider Signalwege denkbar, aus der sowohl anti- als auch proinflammatorische Effekte hervorgehen. Physiologisch bewirkt die Stimulierung mit Noradrenalin eine durch den ADRB2 induzierte vermehrte IL-10 Sekretion als Antwort auf LPS-Stimulierung<sup>54</sup>. Hartwig et al. postulierten, dass dieser Effekt auch durch IgG hervorgerufen werden kann<sup>83</sup>. Diese antiinflammatorische Wirkung des HC-IgG wird durch meine Versuche ebenfalls angedeutet. Da die Stimulierungsdauer in diesen Versuchen auf TNF- $\alpha$  ausgerichtet war, ist es möglich, dass eine veränderte Stimulierungsdauer andere Ergebnisse erbringt. So wurde gezeigt, dass IL-10 bei LPS-Stimulierung von PBMC wesentlich später ansteigt als TNF- $\alpha$ <sup>135</sup>, was die Idee einer anderen Stimulierungsdauer unterstützt.

## 5 Zusammenfassung

Ziel meiner Arbeit war es, Zusammenhänge zwischen von Immunzellen freigesetzten Zytokinen und gegen GPCR gerichteten IgG im Kontext der SSc zu ermitteln. Hierzu wurden nach Stimulierung von THP-1 Zellen mit aus Seren von SSc-Patienten durch Affinitätschromatographie gewonnenem IgG im Vergleich mit Krankheits- und Gesundkontrollen mit Hilfe eines kommerziellen Arrays Veränderungen der Zytokinsekretion (n=80 Zytokine) analysiert. Darüber hinaus wurde die Wirkung von erhöhten Mengen an anti-ADRB2-IgG auf die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  und des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 durch LPS-geprimte und mit SSc-IgG bzw. HC-IgG ko-stimulierte PBMC via ELISA untersucht. Im Vergleich mit HC-IgG wurde nach Stimulierung mit SSc-IgG anhand der Zytokinsekretion von THP-1 Zellen kein Clustering gefunden, was bei der Heterogenität der SSc wesentlich auf die geringe n-Zahl zurückzuführen sein dürfte. Im Vergleich zu HC-IgG bzw. IVIG fanden sich Hinweise auf verändert sezernierte Zytokine (z.B. IGFBP4, MIF, FGF7), deren freigesetzte Menge durch Wechselwirkungen von Immunzellen mit IgG bei der SSc moduliert werden könnte. Einige Ergebnisse, z.B. die verminderte Sekretion von IGFBP4, passen zu bereits in Zusammenhang mit der SSc beschriebenen Aspekten der Pathogenese. Meine Resultate legen zudem nahe, dass hohe Mengen an anti-ADRB2-IgG zu einer vermehrten Sekretion von TNF- $\alpha$  durch geprimte (z.B. durch bakterielle Infektionen) PBMC führen. Ähnliches wurde bei ME/CFS beobachtet. Die Relevanz dieser Wechselwirkung wird durch die positive Korrelation zwischen *in vitro* (stimulierte PBMC sezernieren TNF- $\alpha$ ) und *ex vivo* Daten (anti-ADRB2-IgG-Konzentration im Serum) gestützt. Hohe Mengen an anti-ADRB2-IgG führten auch zu einer verminderten IL-10 Sekretion durch LPS-geprimte Immunzellen, jedoch wurde keine Signifikanz erreicht. Die proinflammatorische Wirkung der Stimulierung von Immunzellen mit einer erhöhten Menge an anti-ADRB2-IgG kann als Folge des Wechsels vom kanonischen antiinflammatorischen zum nicht-kanonischen MAPK-Signalweg auftreten. Zusammenfassend ergeben sich Hinweise darauf, dass IgG gegen ADRB2 oder andere GPCR möglicherweise ein treibender Faktor für ein verändertes, z.B. proinflammatorisches Zytokinsekretions-Muster bei der SSc sind. Zur Validierung meiner Ergebnisse sollten in weiteren Experimenten z.B. die Anzahl der von SSc- und HC-Serum gewonnenen IgG erhöht sowie, falls vorhanden, monoklonale Antikörper gegen ADRB2 verwendet werden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Gabrielli, A., Avvedimento, E. V. & Krieg, T. Scleroderma. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1989–2003 (2009).
2. Allanore, Y. *et al.* Systemic sclerosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **1**, 1–21 (2015).
3. Varga, J. & Abraham, D. Systemic sclerosis: A prototypic multisystem fibrotic disorder. *J. Clin. Invest.* **117**, 557–567 (2007).
4. Carwile LeRoy, E. *et al.* Scleroderma (Systemic Sclerosis): Classification, Subsets and Pathogenesis. *J. Rheumatol.* **15**, 202–205 (1988).
5. Gourh, P. *et al.* Plasma cytokine profiles in systemic sclerosis: Associations with autoantibody subsets and clinical manifestations. *Arthritis Res. Ther.* **11**, 1–11 (2009).
6. Bergamasco, A., Hartmann, N., Wallace, L. & Verpillat, P. Epidemiology of systemic sclerosis and systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. *Clin. Epidemiol.* **11**, 257–273 (2019).
7. Barnes, J. & Mayes, M. D. Epidemiology of systemic sclerosis: Incidence, prevalence, survival, risk factors, malignancy, and environmental triggers. *Curr. Opin. Rheumatol.* **24**, 165–170 (2012).
8. Korte, S. M. & Straub, R. H. Fatigue in inflammatory rheumatic disorders: Pathophysiological mechanisms. *Rheumatol. (United Kingdom)* **58**, v35–v50 (2019).
9. Murthy, S. *et al.* Immunoglobulin G of systemic sclerosis patients programs a pro-inflammatory and profibrotic phenotype in monocyte-like THP-1 cells. *Rheumatol. (United Kingdom)* **60**, 3012–3022 (2021).
10. Cabral-Marques, O. & Riemekasten, G. Functional autoantibodies targeting G protein-coupled receptors in rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* **13**, 648–656 (2017).
11. Akbarzadeh, R., Müller, A., Humrich, J. Y. & Riemekasten, G. When natural antibodies become pathogenic: autoantibodies targeted against G protein-coupled receptors in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Front. Immunol.* **14**, 1–10 (2023).

12. Findeisen, H., Grasshoff, H. & Riemekasten, G. Systemische Sklerose, Teil 2: Therapie. *Rheuma Plus* **19**, 106–114 (2020).
13. Dejaco, C. *et al.* Giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica: Current challenges and opportunities. *Nat. Rev. Rheumatol.* **13**, 578–592 (2017).
14. Pfeil, A., Oelzner, P., Böttcher, J., Jung, C. & Wolf, G. *Rheumatologie : Das Wichtigste für Ärzte aller Fachrichtungen.* (2018).
15. Kitching, A. R. *et al.* ANCA-associated vasculitis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **6:71**, 1–27 (2020).
16. Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T. & Pennington, D. J. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1843**, 2563–2582 (2014).
17. Hieshima, K. *et al.* A novel human CC chemokine PARC that is most homologous to macrophage-inflammatory protein-1 alpha/LD78 alpha and chemotactic for T lymphocytes, but not for monocytes. *J. Immunol.* **159**, 1140–1149 (1997).
18. Islam, S. A., Ling, M. F., Leung, J., Shreffler, W. G. & Luster, A. D. Identification of human CCR8 as a CCL18 receptor. *J. Exp. Med.* **210**, 1889–1898 (2013).
19. Schutysse, E., Richmond, A. & Van Damme, J. Involvement of CC chemokine ligand 18 (CCL18) in normal and pathological processes. *J Leukoc Biol.* **78**, 14–26 (2005).
20. Schupp, J. *et al.* Serum CCL18 is predictive for lung disease progression and mortality in systemic sclerosis. *Eur. Respir. J.* **43**, 1530–1532 (2014).
21. Volkmann, E. R. *et al.* Progression of Interstitial Lung Disease in Systemic Sclerosis: The Importance of Pneumoproteins Krebs von den Lungen 6 and CCL18. *Arthritis Rheumatol.* **71**, 2059–2067 (2019).
22. Mathai, S. K. *et al.* Circulating monocytes from systemic sclerosis patients with interstitial lung disease show an enhanced profibrotic phenotype. *Lab. Investig.* **90**, 812–823 (2010).

23. Rink, L., Kruse, A. & Haase, H. *Immunologie für Einsteiger. Immunologie für Einsteiger* (Springer Berlin Heidelberg, 2015). doi:10.1007/978-3-662-44843-4.
24. Holbrook, J., Lara-Reyna, S., Jarosz-Griffiths, H. & McDermott, M. Tumour necrosis factor signalling in health and disease. *F1000Research* **8**, 1–12 (2019).
25. Bradley, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. *J. Pathol.* **214**, 149–160 (2008).
26. Kalliolias, G. D. & Ivashkiv, L. B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat. Rev. Rheumatol.* **12**, 49–62 (2016).
27. Schmidt, K. *et al.* Bronchoalveolar lavage fluid cytokines and chemokines as markers and predictors for the outcome of interstitial lung disease in systemic sclerosis patients. *Arthritis Res. Ther.* **11**, 1–11 (2009).
28. Kyurkchiev, D. *et al.* Alterations of serum levels of plasminogen, TNF- $\alpha$ , andIDO in granulomatosis with polyangiitis patients. *Vascular* **29**, 874–882 (2021).
29. Pope, J. E. *et al.* State-of-the-art evidence in the treatment of systemic sclerosis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **19**, 212–226 (2023).
30. NCBI. IL10 interleukin 10 [Homo sapiens (human)] Gene. accessed 2022-11-16. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3586>.
31. Mosser, D. M. & Zhang, X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine David. *Immunol Rev.* **226**, 205–218 (2008).
32. Wojciechowska, J. K., Krajewski, W., Kościelska-Kasprzak, K. & Zatoński, T. Serum cytokines in ANCA-associated vasculitis: Correlation with disease-related clinical and laboratory findings. *Med. Clin. (Barc).* **157**, 464–472 (2021).
33. Mirouse, A., Cacoub, P. & Saadoun, D. Regulatory T cells and systemic vasculitis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **35**, 25–30 (2023).

34. Baraut, J., Michel, L., Verrecchia, F. & Farge, D. Relationship between cytokine profiles and clinical outcomes in patients with systemic sclerosis. *Autoimmun. Rev.* **10**, 65–73 (2010).
35. Becker, M. O. *et al.* Serum cytokines and their predictive value in pulmonary involvement of systemic sclerosis. *Sarcoidosis Vasc. Diffus. Lung Dis.* **36**, 274–284 (2019).
36. Elhai, M. *et al.* Performance of Candidate Serum Biomarkers for Systemic Sclerosis–Associated Interstitial Lung Disease. *Arthritis Rheumatol.* **71**, 972–982 (2019).
37. Utsunomiya, A., Oyama, N. & Hasegawa, M. Potential biomarkers in systemic sclerosis: A literature review and update. *J. Clin. Med.* **9**, 1–25 (2020).
38. Scala, E. *et al.* Cytokine and chemokine levels in systemic sclerosis: Relationship with cutaneous and internal organ involvement. *Clin. Exp. Immunol.* **138**, 540–546 (2004).
39. Duan, H. *et al.* Combined analysis of monocyte and lymphocyte messenger RNA expression with serum protein profiles in patients with scleroderma. *Arthritis Rheum.* **58**, 1465–1474 (2008).
40. Sakkas, L. I., Tourtellotte, C., Berney, S., Myers, A. R. & Platsoucas, C. D. Increased levels of alternatively spliced interleukin 4 (IL-4 $\delta$ 2) transcripts in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic sclerosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **6**, 660–664 (1999).
41. Hasegawa, M., Fujimoto, M., Kikuchi, K. & Takehara, K. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* **24**, 328–332 (1997).
42. Furuse, S. *et al.* Serum concentrations of the CXC chemokines interleukin 8 and growth-regulated oncogene- $\alpha$  are elevated in patients with systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* **30**, 1524–1528 (2003).
43. Antonelli, A. *et al.* Th1 and Th2 chemokine serum levels in systemic sclerosis in the presence or absence of autoimmune thyroiditis. *J. Rheumatol.* **35**, 1809–1811 (2008).

44. Yanaba, K. *et al.* Serum CXCL16 Concentrations Correlate with the Extent of Skin Sclerosis in Patients with Systemic Sclerosis. *J. Rheumatol.* **36**, 1917–1923 (2009).
45. Yanaba, K. *et al.* CCL13 is a promising diagnostic marker for systemic sclerosis. *Br. J. Dermatol.* **162**, 332–336 (2010).
46. Kahaleh, M. B. Endothelin, an endothelial-dependent vasoconstrictor in scleroderma. Enhanced production and profibrotic action. *Arthritis Rheum.* **34**, 978–983 (1991).
47. Makino, T., Fukushima, S., Wakasugi, S. & Ihn, H. Decreased serum IL-7 levels in patients with systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **27**, 68–69 (2009).
48. Aydoğdu, E., Pamuk, Ö. N., Dönmez, S. & Pamuk, G. E. Decreased interleukin-20 level in patients with systemic sclerosis: are they related with angiogenesis? *Clin. Rheumatol.* **32**, 1599–1603 (2013).
49. Tiev, K. P. *et al.* Serum CC chemokine ligand-18 predicts lung disease worsening in systemic sclerosis. *Eur. Respir. J.* **38**, 1355–1360 (2011).
50. Weiskopf, D., Weinberger, B. & Grubeck-Loebenstien, B. The aging of the immune system. *Transpl. Int.* **22**, 1041–1050 (2009).
51. Regard, J. B., Sato, I. T. & Coughlin, S. R. Anatomical Profiling of G Protein-Coupled Receptor Expression. *Cell* **135**, 561–571 (2008).
52. Alberts, B. *et al.* *Molekularbiologie der Zelle. Molekularbiologie der Zelle* (2017). doi:10.1002/9783527698448.
53. Xu Shi-Wen, Yunliang Chen, Christopher P. Denton, Mark Eastwood, E. A. R. *et al.* Endothelin-1 Promotes Myofibroblast Induction through the ETA Receptor via a rac/Phosphoinositide 3-Kinase/ Akt-dependent Pathway and Is Essential for the Enhanced Contractile Phenotype of Fibrotic Fibroblasts. *Mol. Biol. Cell* **15**, 2707–2719 (2004).
54. Ağaç, D., Estrada, L. D., Maples, R., Hooper, L. V. & Farrar, J. D. The  $\beta$ 2-adrenergic receptor controls inflammation by driving rapid IL-10 secretion. *Brain. Behav. Immun.* **74**, 176–185 (2018).

55. Jo, M. & Jung, S. T. Engineering therapeutic antibodies targeting G-protein-coupled receptors. *Exp. Mol. Med.* **48**, 1–9 (2016).
56. Weis, W. I. & Kobilka, B. K. The Molecular Basis of G Protein–Coupled Receptor Activation. *Annu Rev Biochem.* **87**, 897–919 (2018).
57. Skiba, M. A. & Kruse, A. C. Autoantibodies as Endogenous Modulators of GPCR Signaling. *Trends Pharmacol. Sci.* **42**, 135–150 (2021).
58. Riemekasten, G. *et al.* Involvement of functional autoantibodies against vascular receptors in systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, 530–536 (2011).
59. Günther, J., Rademacher, J., van Laar, J. M., Siegert, E. & Riemekasten, G. Functional autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin. Immunopathol.* **37**, 529–542 (2015).
60. Fonseca, D. L. M. *et al.* Dysregulated autoantibodies targeting AGTR1 are associated with the accumulation of COVID-19 symptoms. *NPJ Syst. Biol. Appl.* **11:7**, 1–13 (2025).
61. Cabral-Marques, O. *et al.* GPCR-specific autoantibody signatures are associated with physiological and pathological immune homeostasis. *Nat. Commun.* **9:5224**, 1–14 (2018).
62. Yue, X. *et al.* Induced antibodies directed to the angiotensin receptor type 1 provoke skin and lung inflammation, dermal fibrosis and act species overarching. *Ann. Rheum. Dis.* **81**, 1281–1289 (2022).
63. Riemekasten, G., Petersen, F. & Heidecke, H. What Makes Antibodies Against G Protein-Coupled Receptors so Special? A Novel Concept to Understand Chronic Diseases. *Front. Immunol.* **11**, 1–9 (2020).
64. Freitag, H. *et al.* Autoantibodies to vasoregulative g-protein-coupled receptors correlate with symptom severity, autonomic dysfunction and disability in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *J. Clin. Med.* **10**, 1–13 (2021).
65. Müller, F. S. *et al.* Autoantibodies against the chemokine receptor 3 predict cardiovascular risk. *Eur. Heart J.* **44**, 4935–4949 (2023).

66. Rademacher, J. *et al.* Monocytic Angiotensin and Endothelin Receptor Imbalance Modulate Secretion of the Profibrotic Chemokine Ligand 18. *J. Rheumatol.* **43**, 587–591 (2016).
67. Günther, J. *et al.* 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 Res. Ther.* **16**, 1–14 (2014).
68. Kill, A. *et al.* Autoantibodies to angiotensin and endothelin receptors in systemic sclerosis induce cellular and systemic events associated with disease pathogenesis. *Arthritis Res. Ther.* **16**, 1–12 (2014).
69. Becker, M. O. *et al.* Vascular receptor autoantibodies in pulmonary arterial hypertension associated with systemic sclerosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **190**, 808–817 (2014).
70. Yue, X. *et al.* Transfer of PBMC From SSc Patients Induces Autoantibodies and Systemic Inflammation in Rag2<sup>-/-</sup>/IL2rg<sup>-/-</sup> Mice. *Front. Immunol.* **12**, 1–12 (2021).
71. Shu, Y. *et al.* Both T and B cells are indispensable for the development of a PBMC transfer-induced humanized mouse model for SSc. *Arthritis Res. Ther.* **24**, 1–12 (2022).
72. Klapa, S. *et al.* Decreased endothelin receptor A autoantibody levels are associated with early ischaemic events in patients with giant-cell arteritis. *Ann. Rheum. Dis.* **78**, 1443–1444 (2019).
73. Klapa, S. *et al.* Low Concentrations of C5a Complement Receptor Antibodies Are Linked to Disease Activity and Relapse in Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibody–Associated Vasculitis. *Arthritis Rheumatol.* **75**, 760–767 (2023).
74. Alexander, S. P. H. *et al.* THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2019/20: G protein-coupled receptors. *Br. J. Pharmacol.* **176**, S21–S141 (2019).

75. Guide to Pharmacology.  $\beta$ 2-adrenoceptor | Adrenoceptors | *accessed 2024-11-12*. <https://www.guidetopharmacology.org/GRAC/ObjectDisplayForward?objectId=29>.
76. Fraser, C. M. & Venter, J. C. Monoclonal antibodies to  $\beta$ -adrenergic receptors: Use in purification and molecular characterization of  $\beta$  receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 7034–7038 (1980).
77. Rasmussen, S. G. F. *et al.* Crystal Structure of the  $\beta$ 2 Adrenergic Receptor-Gs protein complex. *Nature* **477**, 549–555 (2012).
78. Bellinger, D. L. & Lorton, D. Sympathetic nerve hyperactivity in the spleen: Causal for nonpathogenic-driven chronic immune-mediated inflammatory diseases (IMIDS)? *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
79. Pearson, G. *et al.* Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions\*. *Endocr. Rev.* **22**, 153–183 (2001).
80. Ernst, D. *et al.* Beta-1-Adrenergic Receptor Antibodies in Acute Coronary Syndrome: Is Less Sometimes More? *Front. Cardiovasc. Med.* **5**, 1–9 (2018).
81. Ernst, D. *et al.* Lowered anti-beta1 adrenergic receptor antibody concentrations may have prognostic significance in acute coronary syndrome. *Sci. Rep.* **9**, 1–8 (2019).
82. Jünemann, A. *et al.* Agonistic autoantibodies to the  $\beta$ 2-adrenergic receptor involved in the pathogenesis of open-angle glaucoma. *Front. Immunol.* **9**, 1–17 (2018).
83. Hartwig, J. *et al.* IgG stimulated  $\beta$ 2 adrenergic receptor activation is attenuated in patients with ME/CFS. *Brain, Behav. Immun. - Heal.* **3**, 1–6 (2020).
84. Van Den Hoogen, F. *et al.* 2013 classification criteria for systemic sclerosis: An american college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* **65**, 2737–2747 (2013).
85. Giil, L. M. *et al.* Antibodies to multiple receptors are associated with neuropsychiatric symptoms and mortality in Alzheimer’s disease: A longitudinal study. *J. Alzheimer’s Dis.* **64**, 761–774 (2018).

86. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
87. Bio-Rad. *Bio-Rad Protein Assay*. doi:10.1101/pdb.prodprot15.
88. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH. THP-1 (ACC16). accessed 2022-11-02. <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-16>.
89. Tsuchiya, S. *et al.* Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* **26**, 171–176 (1980).
90. RnD Systems. Human CCL18/PARC DuoSet ELISA. <https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/dy394.pdf?v=20250529>.
91. BioLegend Inc. Human TNF- $\alpha$  ELISA Max Standard Set. [https://d1spbj2x7qk4bg.cloudfront.net/Files/Images/media\\_assets/pro\\_detail/datasheets/430201\\_Human\\_TNF-a\\_Standard.pdf?v=20250227010954](https://d1spbj2x7qk4bg.cloudfront.net/Files/Images/media_assets/pro_detail/datasheets/430201_Human_TNF-a_Standard.pdf?v=20250227010954).
92. BioLegend. Human IL-10 ELISA Max Standard Set. [https://d1spbj2x7qk4bg.cloudfront.net/Files/Images/media\\_assets/pro\\_detail/datasheets/430601\\_Human\\_IL-10\\_Standard.pdf?v=20250504063154](https://d1spbj2x7qk4bg.cloudfront.net/Files/Images/media_assets/pro_detail/datasheets/430601_Human_IL-10_Standard.pdf?v=20250504063154).
93. Invivogen. HEK-Blue™ LPS Detection Kit 2. <https://www.invivogen.com/hek-blue-lps-detection-kit>.
94. Cavaillon, J. M. Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines. *Toxicon* **149**, 45–53 (2018).
95. BioSell. FBS Low Endotoxin. <https://www.bio-sell.de/en/cell-culture/foetal-calf-sera-fcs/fcs-low-endotoxin.html>.
96. Biontix. MycoSPY® Master Mix mit Ladepuffer und Tracking-Farbstoff, lyophilisiert PCR-Kit zum Nachweis von Mykoplasmen. [www.biontix.com](http://www.biontix.com), Manual DE 0218.
97. RayBiotech Inc. RayBio® Human Cytokine Antibody Array 5 (G Series). <https://docs.raybiotech.com/files/manuals/AAH-CYT-G5.pdf>.
98. Michels, H., Burmester, G.-R. & Buttgereit, F. i.v.-Immunglobuline bei chronischen idiopathischen Myositiden. *Z. Rheumatol.* **64**, 102–110 (2005).

99. Schwab, I. & Nimmerjahn, F. Intravenous immunoglobulin therapy: How does IgG modulate the immune system? *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 176–189 (2013).
100. Noguchi, K., Gel, Y. R., Brunner, E. & Konietzschke, F. nparLD: An R Software Package for the Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments. *J. Stat. Softw.* **50**, 1–23 (2012).
101. Abraham, D. J. *et al.* An international perspective on the future of systemic sclerosis research. *Nat. Rev. Rheumatol.* **21**, 174–187 (2025).
102. Baxter, E. W. *et al.* Standardized protocols for differentiation of THP-1 cells to macrophages with distinct M(IFN $\gamma$ +LPS), M(IL-4) and M(IL-10) phenotypes. *J. Immunol. Methods* **478**, 1–11 (2020).
103. Schildberger, A., Rossmannith, E., Eichhorn, T., Strassl, K. & Weber, V. Monocytes, peripheral blood mononuclear cells, and THP-1 cells exhibit different cytokine expression patterns following stimulation with lipopolysaccharide. *Mediators Inflamm.* **2013**, 1–10 (2013).
104. Eleftheriadis, G. Analyse der Signaltransduktion in monozytären THP-1 Zellen nach Applikation von Immunglobulin G von Patienten mit systemischer Sklerose. (Universität zu Lübeck, 2020).
105. Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M. & Myrtek, D. *Der Experimentator Immunologie 4. Auflage.* (2014). doi:10.1007/978-3-642-41899-0.
106. Canady, J., Arndt, S., Karrer, S. & Bosserhoff, A. K. Increased KGF expression promotes fibroblast activation in a double paracrine manner resulting in cutaneous fibrosis. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 647–657 (2013).
107. NCBI. NTF4 neurotrophin 4 [Homo sapiens (human)] Gene. accessed 2022-11-19. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4909>.
108. Stucky, C. L. & Shin, J. B. Neurotrophin-4: A survival factor for adult sensory neurons. *Curr. Biol.* **12**, 1401–1404 (2002).
109. Ding, H. & Wu, T. Insulin-like growth factor binding proteins in autoimmune diseases. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **9**, 1–9 (2018).

110. NCBI. CCL26 C-C motif chemokine ligand 26 [ Homo sapiens (human)] Gene. *accessed 2022-11-16*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10344>.
111. NCBI. EGF epidermal growth factor [ Homo sapiens (human) ] Gene. *accessed 2022-11-20*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1950>.
112. Planque, S. *et al.* Autoantibodies to the epidermal growth factor receptor in systemic sclerosis, lupus, and autoimmune mice. *FASEB J.* **17**, 136–143 (2003).
113. Arts, M. R. *et al.* Systemic sclerosis immunoglobulin induces growth and a pro-fibrotic state in vascular smooth muscle cells through the epidermal growth factor receptor. *PLoS One* **9**, 1–9 (2014).
114. Farhadi, E. *et al.* Attenuation of aquaporin-3 and epidermal growth factor receptor expression and activation in systemic sclerosis dermal fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* **234**, 12876–12883 (2019).
115. Trus, E., Basta, S. & Gee, K. Who's in charge here? Macrophage colony stimulating factor and granulocyte macrophage colony stimulating factor: Competing factors in macrophage polarization. *Cytokine* **127**, 1–8 (2020).
116. Sweet, M. J. & Hume, D. A. CSF-1 as a regulator of macrophage activation and immune responses. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. **51**, 169–177 (2003).
117. Maurer, M. & Von Stebut, E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 1882–1886 (2004).
118. Colucci-D'amato, L., Speranza, L. & Volpicelli, F. Neurotrophic factor bdnf, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration and brain cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–29 (2020).
119. Wang, N. & Tian, B. Brain-derived neurotrophic factor in autoimmune inflammatory diseases (Review). *Exp. Ther. Med.* **22**, 1–7 (2021).
120. Lise, M.-C. *et al.* Serum Neurotrophin Profile in Systemic Sclerosis Marie-Claude. *PLoS One* **5**, 1–7 (2010).
121. Calandra, T. & Roger, T. Macrophage migration inhibitory factor: A regulator of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 791–800 (2003).

122. Kim, J. Y. *et al.* Up-regulated macrophage migration inhibitory factor protects apoptosis of dermal fibroblasts in patients with systemic sclerosis. *Clin. Exp. Immunol.* **152**, 328–335 (2008).
123. Baños-Hernández, C. J. *et al.* Expression of macrophage migration inhibitory factor and its receptor CD74 in systemic sclerosis. *Cent. Eur. J. Immunol.* **46**, 375–383 (2021).
124. Leng, L. *et al.* MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J. Exp. Med.* **197**, 1467–1476 (2003).
125. Starlets, D. *et al.* Cell-surface CD74 initiates a signaling cascade leading to cell proliferation and survival. *Blood* **107**, 4807–4816 (2006).
126. Xu, S. *et al.* Anti-CD74 antibodies in spondyloarthritis: A systematic review and meta-analysis. *Semin. Arthritis Rheum.* **51**, 7–14 (2021).
127. Al-Adwi, Y. *et al.* Macrophages as determinants and regulators of fibrosis in systemic sclerosis. *Rheumatol. (United Kingdom)* **62**, 535–545 (2023).
128. Becker, H. *et al.* Relationship between serum levels of macrophage migration inhibitory factor and the activity of antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitides. *Clin. Rheumatol.* **25**, 368–372 (2006).
129. Su, Y. Y. *et al.* Insulin-like growth factor binding protein-4 exerts antifibrotic activity by reducing levels of connective tissue growth factor and the C-X-C chemokine receptor 4. *FASEB BioAdvances* **1**, 167–179 (2019).
130. Guide to Immunopharmacology.  $\beta$ 2-adrenoceptor | Adrenoceptors | accessed 2024-11-12. <https://www.guidetoimmunopharmacology.org/GRAC/ObjectDisplayForward?objectId=29>.
131. Kizaki, T. *et al.*  $\beta$ 2-Adrenergic receptor regulate Toll-like receptor 4-induced late-phase NF- $\kappa$ B activation. *Mol. Immunol.* **46**, 1195–1203 (2009).
132. Izeboud, C. A., Monshouwer, M., Miert, A. S. J. P. A. M. Van & Witkamp, R. F. The  $\beta$ -adrenoceptor agonist clenbuterol is a potent inhibitor of the LPS-induced production of TNF- $\alpha$  and IL-6 in vitro and in vivo. *Inflamm. Res.* **48**, 497–502 (1999).

133. Verhoeckx, K. C. M., Doornbos, R. P., Greef, J. Van Der, Witkamp, R. F. & Rodenburg, R. J. T. Inhibitory effects of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor agonist zilpaterol on the LPS-induced production of TNF- $\alpha$  in vitro and in vivo. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **28**, 531–537 (2005).
134. Mohan, M. L., Vasudevan, N. T. & Prasad, S. V. N. Proinflammatory Cytokines Mediate GPCR Dysfunction. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **70**, 61–73 (2017).
135. Janský, L., Reymanová, P. & Kopecký, J. Dynamics of Cytokine Production in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Stimulated by LPS or Infected by *Borrelia*. *Physiol. Res.* **52**, 593–598 (2003).
136. Guide to Pharmacology. CCL2 | Ligand page |. accessed 2022-11-16. <https://www.guidetopharmacology.org/GRAC/LigandDisplayForward?ligandId=771>.

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb.1:</b> Pathogenese der SSc	S.16
<b>Abb.2:</b> GPCR-Aktivierung und Signalwege	S.26
<b>Abb.3:</b> Struktur des biologischen Komplexes aus ADRB2 und G-Protein	S.30
<b>Abb.4:</b> Im RayBio® Human Cytokine Antibody Array 5 (G-Series) gemessene Zytokine	S.54
<b>Abb.5:</b> LPS (EU/mL) in den IgG-Proben	S.57
<b>Abb.6:</b> CCL18 Sekretion (pg/mL) von THP-1 Zellen nach Stimulierung mit HC-, SSc-, RZA- und GPA-IgG	S.58
<b>Abb.7:</b> Schwach positive Korrelation zwischen Alter der IgG-Spender und IgG-induzierter CCL18-Freisetzung	S.59
<b>Abb.8:</b> Hauptkomponentenanalysen und Scree-Plots des Zytokin Arrays	S.61
<b>Abb.9:</b> Zytokinsekretion nach Stimulierung von THP-1 Zellen mit IgG	S.63
<b>Abb.10:</b> Hauptkomponentenanalyse und Scree-Plot des Zytokin Arrays gemeinsam mit Ergebnissen des vorhergegangenen Zytokin Arrays	S.64
<b>Abb.11:</b> Zytokinsekretion nach Stimulierung von THP-1 Zellen mit IgG bei erhöhter Anzahl an Messwerten	S.66-67
<b>Abb.12:</b> Zytokinsekretion nach Stimulierung von THP-1 Zellen mit IgG (SSc vs. IVIG)	S.70
<b>Abb.13:</b> Zytokinsekretion nach Stimulierung von THP-1 Zellen mit IgG (RZA vs. IVIG)	S.71

<b>Abb.14:</b> Signalweg Analyse mit dem Panther analysis tool	S.72
<b>Abb.15:</b> Heatmap zur Untersuchung eines möglichen Clusterings	S.73
<b>Abb.16:</b> ADRB1- und ADRB2-Antikörperkonzentrationen in HC und SSc	S.74
<b>Abb.17:</b> Bei der hier untersuchten SSc-Gruppe gehen erhöhte ADRB2-Antikörperkonzentrationen im Serum mit erhöhten ADRB2-Antikörperkonzentrationen im IgG einher	S.75
<b>Abb.18:</b> TNF- $\alpha$ Sekretion durch geprimte PBMC bei sieben Zeitpunkten	S.76
<b>Abb.19:</b> Abstrahierte und für multiples Testen nach Bonferroni korrigierte Messwerte der TNF- $\alpha$ Sekretion geprimter PBMC nach Ko-Stimulierung durch IgG in Versuch 2 und 3	S.81
<b>Abb.20:</b> Gruppenvergleich abstrahierter Messwerte der TNF- $\alpha$ Sekretion durch PBMC nach Ko-Stimulierung mit IgG in Versuch 2 und 3	S.82
<b>Abb.21:</b> Korrelation der im Zellkulturüberstand sezernierten TNF- $\alpha$ Konzentration und der anti-ADRB2 Antikörperkonzentration im Serum von SSc Patienten und HC	S.83
<b>Abb.22:</b> Korrelation der im Zellkulturüberstand sezernierten TNF- $\alpha$ Konzentration und der ADRB2-Antikörperkonzentration im Serum der SSc Patienten	S.84
<b>Abb.23:</b> Abstrahierte und für multiples Testen nach Bonferroni korrigierte Messwerte der IL-10 Sekretion geprimter PBMC nach Ko-Stimulierung durch IgG in Versuch 2 und 3	S.86
<b>Abb.24:</b> Gruppenvergleich abstrahierter Messwerte der IL-10 Sekretion von PBMC nach Ko-Stimulierung mit IgG in Versuch 2 und 3	S.87

## 7.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tbl.1a:</b>	In der SSc im Vergleich zu HC veränderte (↑ erhöhte oder ↓ verminderte) Zytokine/ andere Moleküle	S.22
<b>Tbl.1b:</b>	Ausgewählte Zytokine/ andere Moleküle als Prädiktoren für Verläufe von klinischen Manifestationen in der SSc	S.23
<b>Tbl.2:</b>	Veränderte Zytokinsekretion nach <i>in vitro</i> Stimulierung verschiedener Zellen mit SSc-IgG im Vergleich zu gesunden Kontrollen	S.33
<b>Tbl.3a-d:</b>	Klinische Charakterisierung der Probanden (SSc, HC, GPA, RZA) für den THP-1 Stimulierungsversuch	S.42-43
<b>Tbl.4a-c:</b>	Klinische Charakterisierung der Probanden (SSc ADRB2 ab <sup>normal</sup> , SSc ADRB2 ab <sup>high</sup> , HC) für den PBMC Stimulierungsversuch	S.43-44
<b>Tbl.5a-d:</b>	Klinische Charakterisierung der Probanden (SSc alleinige Auswertung, RZA, HC, SSc gemeinsame Auswertung) für den Zytokin Array	S.45-46
<b>Tbl.6:</b>	Die Ergebnisse des HEK-Blue™LPS Detection Kit 2 weisen auf keine bzw. geringe Mengen an Endotoxin in den IgG hin	S.57
<b>Tbl.7:</b>	Überblick der Zytokine, die nach Stimulierung der THP-1 Zellen mit SSc-IgG und RZA-IgG im Vergleich zu HC verändert sezerniert werden	S.62

<b>Tbl.8:</b>	Überblick der Zytokine, die bei erhöhter Anzahl an Messwerten nach Stimulierung der THP-1 Zellen mit SSc-IgG und RZA-IgG im Vergleich zu HC verändert sezerniert werden	S.65
<b>Tbl. 9:</b>	Überblick der Zytokine, die nach Stimulierung der THP-1 Zellen mit SSc-IgG und RZA-IgG im Vergleich zu IVIG verändert sezerniert werden	S.69
<b>Tbl.10:</b>	Paarweise Vergleiche abstrahierter Messwerte der TNF- $\alpha$ Sekretion durch PBMC nach Ko-Stimulierung mit IgG	S.80
<b>Tbl.11:</b>	Gruppenvergleich abstrahierter Messwerte der TNF- $\alpha$ Sekretion durch PBMC nach Ko-Stimulierung mit IgG	S.82
<b>Tbl.12:</b>	Paarweise Vergleiche abstrahierter Messwerte der IL-10 Sekretion durch PBMC (n=2, 2 ng/mL, 6h) nach Ko-Stimulierung mit IgG	S.85
<b>Tbl.13:</b>	Gruppenvergleich abstrahierter Messwerte der IL-10 Sekretion durch PBMC (n=2, 2 ng/mL, 6h) nach Ko-Stimulierung mit IgG	S.87

### 7.3 Veröffentlichungen

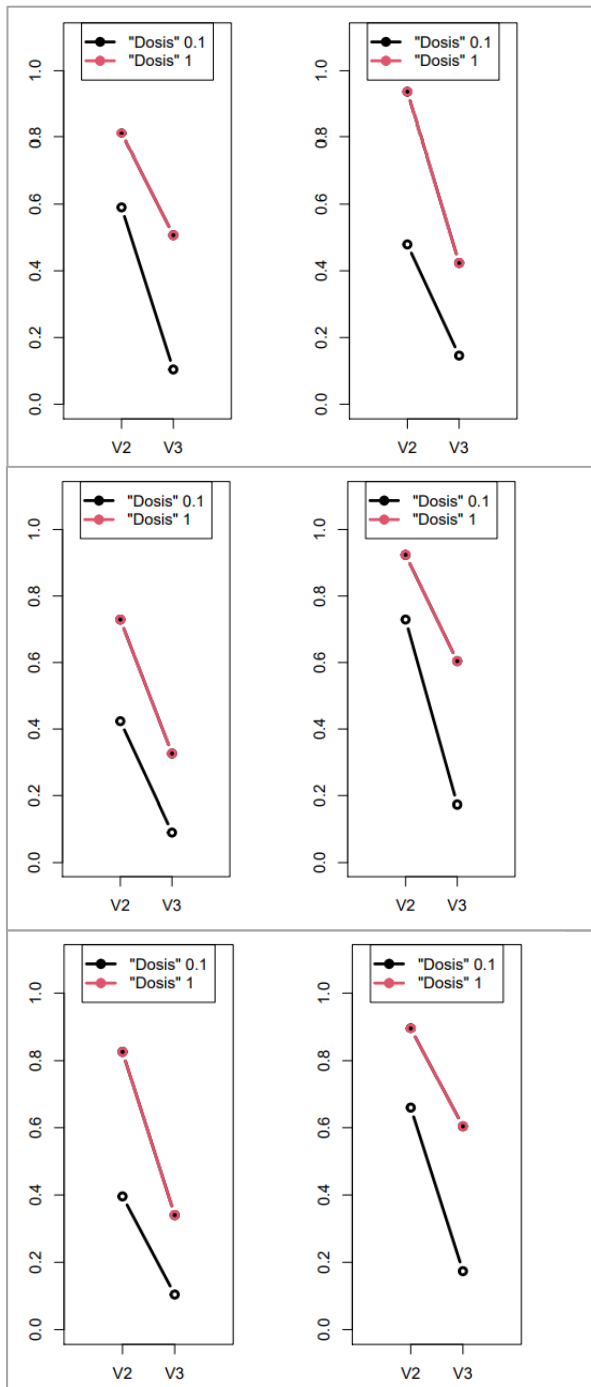
Kongressbeiträge:

**Mackedanz P**, Graßhoff H, Marschner G, Comdühr S, Heidecke H, Müller A, Riemekasten G, Schumann A. Anti-ADRB2 antibodies in systemic sclerosis affect the inflammatory cytokine response of immune cells. Poster im Rahmen des 49. Kongresses der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, virtuell, vom 15.-18.09.2021.

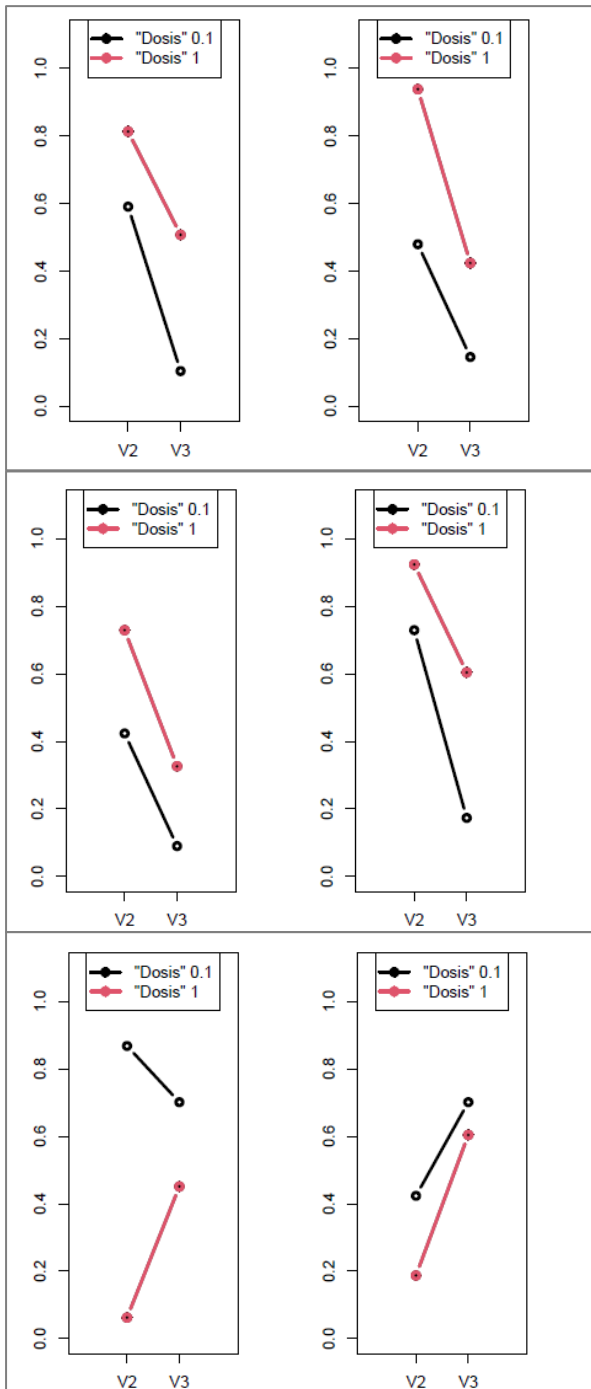
**Mackedanz P**, Graßhoff H, Marschner G, Comdühr S, Heidecke H, Thiele D, Müller A, Lange T, Schumann A, Riemekasten G. The inflammatory cytokine response of peripheral blood mononuclear cells is modulated by anti-ADRB2 antibodies derived from patients with systemic sclerosis. Poster im Rahmen des 7. Systemic Sclerosis World Congress, virtuell, vom 10.-12.03.2022.

**Mackedanz P**, Graßhoff H, Hackel A, Murthy S, Busch H, Sadik CD, Müller A, Schumann A, Künstner A, Riemekasten G. IgG derived from systemic sclerosis and giant cell arteritis patients evokes a different cytokine response of THP-1 cells than healthy control IgG. Poster im Rahmen des 50. Kongresses der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, Berlin, vom 31.08.-03.09.2022.

## 7.4 Weiterführende Abbildungen



**7.4.1:** Paarweise Vergleiche abstrahierter Messwerte der TNF- $\alpha$  Sekretion von PBMC ( $n=2$ , 2 ng/mL, 6h) nach Ko-Stimulierung mit IgG ( $c=1$  mg/mL bzw. 100  $\mu$ g/mL) in Versuch 2 und 3. Unterschiede bezogen auf die Stimulierungsgruppen ergaben sich im Vergleich von HC und SSc ADRB2 ab<sup>high</sup> (mittig, links: HC; rechts: SSc ADRB2 ab<sup>high</sup>,  $p=0.00000337$ ) und im Vergleich von SSc ADRB2 ab<sup>normal</sup> und SSc ADRB2 ab<sup>high</sup> (unten, links: SSc ADRB2 ab<sup>normal</sup>; rechts: SSc ADRB2 ab<sup>high</sup>,  $p=0.0025$ ). Kein Unterschied zwischen HC und SSc ADRB2 ab<sup>normal</sup> (oben, links: HC; rechts: SSc ADRB2 ab<sup>normal</sup>,  $p=0.868$ ). In allen Vergleichen sind zudem Unterschiede zwischen den IgG-Konzentrationen (Dosis) und den verschiedenen Versuchen zu erkennen (V2, V3, alle  $p<0.0001$ , s. Anhang Punkt 7.4.3). Die Abbildung wurde vom Institut für Medizinische Biometrie und Statistik erstellt. Statistische Berechnung mit Hilfe einer non-parametrischen Methode für faktorielles Design nach Noguchi K. et al.



**7.4.2:** Paarweise Vergleiche abstrahierter Messwerte der IL-10 Sekretion von PBMC (n=2, 2 ng/mL, 6h) nach Ko-Stimulierung mit IgG (c=1 mg/mL bzw. 100 µg/mL) in Versuch 2 und 3. Ein Unterschied bezogen auf die Stimulierungsgruppen ergab sich im Vergleich von HC und SSc ADRB2 ab<sup>high</sup> (mittig, links: HC; rechts: SSc ADRB2 ab<sup>high</sup>, p=0.0000337). Kein Unterschied zwischen HC und SSc ADRB2 ab<sup>normal</sup> (oben, links: HC; rechts: SSc ADRB2 ab<sup>normal</sup>, p=0.868) und im Vergleich von SSc ADRB2 ab<sup>normal</sup> und SSc ADRB2 ab<sup>high</sup> (unten, links: SSc ADRB2 ab<sup>normal</sup>; rechts: SSc ADRB2 ab<sup>high</sup>, p=0.55). In allen Vergleichen sind zudem Unterschiede zwischen den IgG-Konzentrationen (Dosis) und den verschiedenen Versuchen zu erkennen (V2, V3, alle p<0.0001, s. Anhang Punkt 7.4.3). Die Abbildung wurde vom Institut für Medizinische Biometrie und Statistik erstellt. Statistische Berechnung mit Hilfe einer non-parametrischen Methode für faktorielles Design nach Noguchi K. et al.

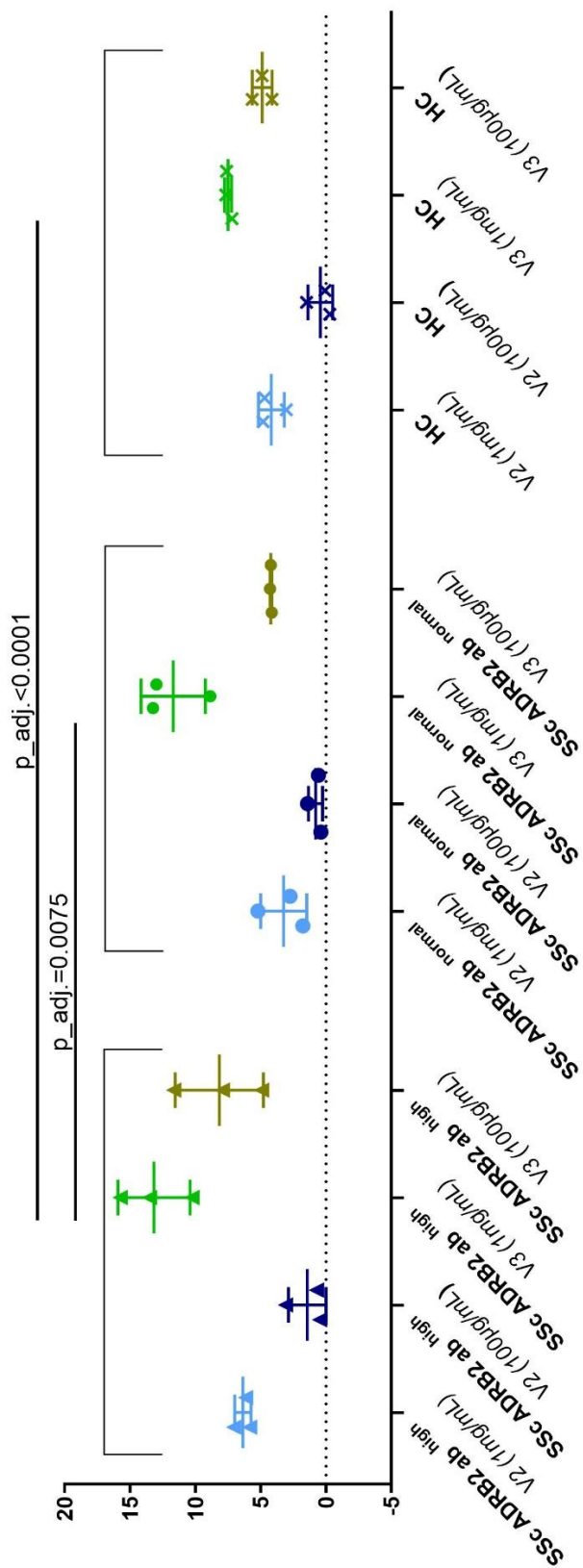
**7.4.3:** Gruppenvergleiche sowie paarweise Vergleiche abstrahierter Messwerte der TNF- $\alpha$  und IL-10 Sekretion von PBMC (n=2, 2 ng/mL, 6h) nach Ko-Stimulierung mit IgG (c=1 mg/mL und 100  $\mu$ g/mL) in Versuch 2 und 3. Tabellarische Darstellung der p-Werte der Unterschiede bei Betrachtung von je einer einzelnen Variable (Stimulierungsgruppen, IgG-Konzentration, Spender) unter Abstraktion auf die jeweils beiden anderen, sowie bei Betrachtung zweier Variablen unter Abstraktion auf die übrig gebliebene. Zudem ist ein nicht näher bezeichneter Behandlungseffekt dargestellt, der auch bei Berücksichtigung aller Gruppenunterschiede bestehen bleibt. Auswertung durch das Institut für Medizinische Biometrie und Statistik generiert. Statistische Auswertung mit Hilfe einer non-parametrischen Methode für faktorielles Design nach Noguchi K. et al. Von oben nach unten: Gruppenvergleich für die TNF- $\alpha$  Sekretion, paarweiser Vergleich für die TNF- $\alpha$  Sekretion, Gruppenvergleich für die IL-10 Sekretion, paarweiser Vergleich für die IL-10 Sekretion.

Variablen	p-Wert
Stimulierungsgruppen	$1.95 \times 10^{-5}$
IgG-Konzentration	$8.12 \times 10^{-19}$
Spender (V2, V3)	$4.88 \times 10^{-33}$
Stimulierungsgruppen, IgG-Konzentration	$7.03 \times 10^{-1}$
Stimulierungsgruppen, Spender	$7.69 \times 10^{-1}$
IgG-Konzentration, Spender	$6.37 \times 10^{-1}$
Berücksichtigung aller Variablen	$6.70 \times 10^{-3}$

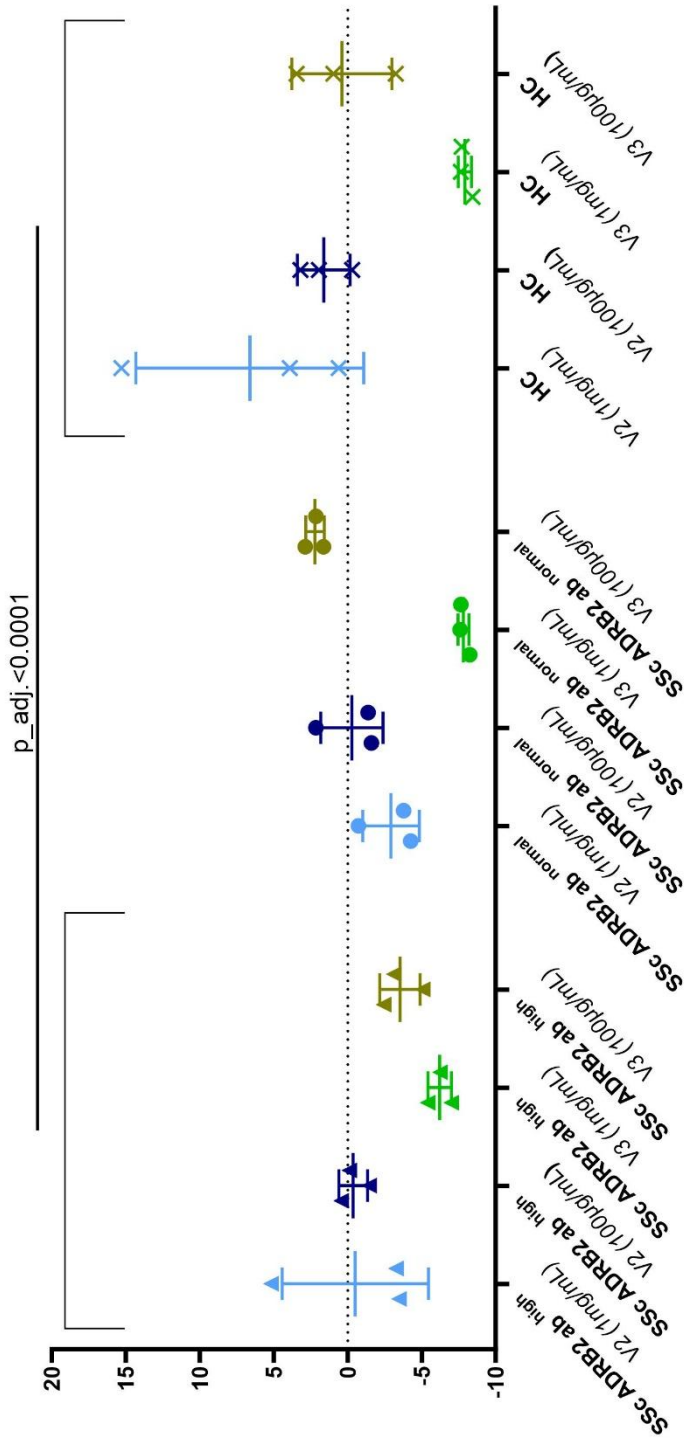
Variablen	p-Wert HC vs. SSc ADRB2 ab <sup>normal</sup>	p-Wert HC vs. SSc ADRB2 ab <sup>high</sup>	p-Wert SSc ADRB2 ab <sup>normal</sup> vs. SSc ADRB2 ab <sup>high</sup>
Stimulierungsgruppen	$8.68 \times 10^{-1}$	$3.37 \times 10^{-6}$	$2.50 \times 10^{-3}$
IgG-Konzentration	$3.17 \times 10^{-16}$	$3.05 \times 10^{-10}$	$1.47 \times 10^{-9}$
Spender (V2, V3)	$6.91 \times 10^{-13}$	$5.72 \times 10^{-24}$	$1.67 \times 10^{-31}$
Stimulierungsgruppen, IgG-Konzentration	$5.05 \times 10^{-1}$	$6.53 \times 10^{-1}$	$1.00 \times 10^0$
Stimulierungsgruppen, Spender	$8.08 \times 10^{-1}$	$3.84 \times 10^{-1}$	$1.00 \times 10^0$
IgG-Konzentration, Spender	$1.00 \times 10^0$	$2.96 \times 10^{-1}$	$1.00 \times 10^0$
Berücksichtigung aller Variablen	$1.14 \times 10^{-1}$	$5.55 \times 10^{-2}$	$3.51 \times 10^{-3}$

Variablen	p-Wert
Stimulierungsgruppen	1.11x10 <sup>-1</sup>
IgG-Konzentration	6.31x10 <sup>-5</sup>
Spender (V2, V3)	1.02x10 <sup>-61</sup>
Stimulierungsgruppen, IgG-Konzentration	1.19x10 <sup>-1</sup>
Stimulierungsgruppen, Spender	3.18x10 <sup>-3</sup>
IgG-Konzentration, Spender	2.30x10 <sup>-4</sup>
Berücksichtigung aller Variablen	9.14x10 <sup>-2</sup>

Variablen	p-Wert	p-Wert	p-Wert
	HC vs. SSc ADRB2 ab <sup>normal</sup>	HC vs. SSc ADRB2 ab <sup>high</sup>	SSc ADRB2 ab <sup>normal</sup> vs. SSc ADRB2 ab <sup>high</sup>
Stimulierungsgruppen	<b>8.68x10<sup>-1</sup></b>	<b>3.37x10<sup>-6</sup></b>	<b>5.50x10<sup>-1</sup></b>
IgG-Konzentration	3.17x10 <sup>-16</sup>	3.05x10 <sup>-10</sup>	6.52x10 <sup>-7</sup>
Spender (V2, V3)	6.91x10 <sup>-13</sup>	5.72x10 <sup>-24</sup>	2.57x10 <sup>-4</sup>
Stimulierungsgruppen, IgG-Konzentration	5.05x10 <sup>-1</sup>	6.53x10 <sup>-1</sup>	9.68x10 <sup>-3</sup>
Stimulierungsgruppen, Spender	8.08x10 <sup>-1</sup>	3.84x10 <sup>-1</sup>	5.97x10 <sup>-2</sup>
IgG-Konzentration, Spender	1.00x10 <sup>0</sup>	2.96x10 <sup>-1</sup>	5.62x10 <sup>-3</sup>
Berücksichtigung aller Variablen	1.14x10 <sup>-1</sup>	5.55x10 <sup>-2</sup>	9.66x10 <sup>-2</sup>



**7.4.4:** Abstrahierte und für multiples Testen nach Bonferroni korrigierte Messwerte der TNF- $\alpha$  Sekretion geprimter PBMC (n=2, 2 ng/mL, 6h) nach Ko-Stimulierung durch IgG (c=1 mg/mL und 100  $\mu$ g/mL) in Versuch 2 und 3. Darstellung der paarweisen Vergleiche (Tbl. 10). HC vs. SSc ADRB2 ab<sup>high</sup>:  $p_{\text{adj.}} = 0.00001011$ , SSc ADRB2 ab<sup>normal</sup> vs. SSc ADRB2 ab<sup>high</sup>:  $p_{\text{adj.}} = 0.0075$ , HC vs. SSc ADRB2 ab<sup>normal</sup>:  $p_{\text{adj.}} = 2.604$ .



**7.4.5:** Abstrahierte und für multiples Testen nach Bonferroni korrigierte Messwerte der IL-10 Sekretion geprimter PBMC (n=2, 2 ng/mL, 6h) nach Ko-Stimulierung durch IgG (c=1 mg/mL und 100 µg/mL) in Versuch 2 und 3. Darstellung der paarweisen Vergleiche (Tbl. 12). HC vs. SSc ADRB2 ab<sup>high</sup>: p<sub>adj.</sub> =0.00001011, SSc ADRB2 ab<sup>normal</sup> vs. SSc ADRB2 ab<sup>high</sup>: p<sub>adj.</sub> =1.65, HC vs. SSc ADRB2 ab<sup>normal</sup>: p<sub>adj.</sub> =2.604.

## 7.5 Ethikvotum

### Anhang 7.5 a: Ethikvotum Aktenzeichen 16-199



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Frau  
Prof. Dr. med. Gabriela Riemekasten  
Direktorin der Klinik für Rheumatologie und  
klinische Immunologie

Im Hause

#### Ethik-Kommission

Vorsitzender:  
Herr Prof. Dr. med. Alexander Katalinic  
Stellv. Vorsitzender  
Herr Prof. Dr. med. Frank Gieseler  
Universität zu Lübeck  
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: 20. September 2019

#### Identifikation und Charakterisierung von neuen Biomarkern bei entzündlichen Systemerkrankungen Hier: Ihr Schreiben vom 13. September 2019

Sehr geehrte Frau Prof. Riemekasten,


vielen Dank für die überarbeiteten Unterlagen zu Ihrem 2. Amendment-Antrag.

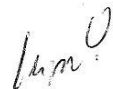
Die Ethik-Kommission bewertet die nachträglichen Erweiterungen zustimmend.

Folgende Unterlagen lagen vor:

- Ihr Anschreiben mit ausführlichen Erläuterungen vom 13. September 2019
- Basisformular vom 13. September 2019
- Patienteninformation und Einwilligungserklärung in der Version 2
- Studienprotokoll in der Version 3.

Mit freundlichen Grüßen

  
Prof. Dr. med. Alexander Katalinic  
Vorsitzender



## Anhang 7.5 b: Ethikvotum Aktenzeichen 2023-113\_4



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck Ratzeburger Allee 160 23562 Lübeck

Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie  
Universität zu Lübeck  
Frau Prof. Dr. med. Tanja Lange  
Ratzeburger Allee 160  
23562 Lübeck  
Deutschland

### Ethik-Kommission

#### Vorsitzender:

Herr Prof. Dr. med. Alexander Katalinic

#### Stellv. Vorsitzender:

Herr Prof. Dr. med. Andreas Moser

#### Geschäftsstelle:

Dr. rer. nat. Inga Kaufhold +49(0)451 3101 1386  
Dr. rer. nat. Christopher Link +49(0)451 3101 1389  
Doris Seuthe +49(0)451 3101 1385  
Tanja Arnold +49(0)451 3101 1388

E-Mail: [ethikkommission@uni-luebeck.de](mailto:ethikkommission@uni-luebeck.de)

Website: [www.uni-luebeck.de/forschung/kommissionen/ethikkommission](http://www.uni-luebeck.de/forschung/kommissionen/ethikkommission)

Aktenzeichen: 2023-113\_4  
20.01.2025 / IK

### Verkürztes Verfahren - Amendment

Antragsteller: Prof. Dr. med. Tanja Lange

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

**Hier: Ihre Einreichung vom 09.01.2025, Beurteilung für die DFG: 'AB and EV in chronic pain'**

Sehr geehrte Frau Prof. Dr. med. Tanja Lange,

Die Ethik-Kommission nimmt die nachträglichen Änderungen zustimmend zur Kenntnis.

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. Alexander Katalinic  
Vorsitzender der Ethik-Kommission

#### Allgemeine Hinweise:

Ggf. aufgeführte Hinweise sind zu berücksichtigen. Eine Wiedervorlage ist nicht nötig. Bei Bedarf eines Votums ohne Hinweise sind die angepassten Dokumente als Amendment vorzulegen. Änderungen sind hervorzuheben. Änderungen im Studienverlauf sind anzuzeigen. Das Antragsformular Amendment ist zu nutzen. Änderungen sind hervorzuheben. Datenschutzrechtliche Aspekte von Forschungsvorhaben werden durch die Ethikkommission grundsätzlich nur cursorsisch geprüft. Dieses Votum / diese Bewertung ersetzt mithin nicht die Konsultation des zuständigen Datenschutzbeauftragten.

#### Vorgelegte Dokumente

- 1) Anschreiben.pdf vom 09.01.2025
- 2) AZ16-199 Patienteninformation, Amendment 2025, Version 5.pdf vom 17.01.2025
- 3) AZ16-199 Patienteninformation, Amendment 2025, Version 5\_clean.pdf vom 17.01.2025
- 4) AZ16-199 Studienprotokoll, Amendment 2025, Version 6.pdf vom 17.01.2025
- 5) AZ16-199 Studienprotokoll, Amendment 2025, Version 6\_clean.pdf vom 17.01.2025
- 6) AZ2023-113\_Anschreiben Ethikkommission.pdf vom 17.01.2025
- 7) Basisformular\_Az\_16199\_Amendment2025\_v4.pdf vom 17.01.2025
- 8) Basisformular\_Az\_16199\_Amendment2025\_v4\_clean.pdf vom 17.01.2025
- 9) German-Israel proposal-301024-final.pdf vom 09.01.2025

## 7.6 Danksagung

Ich bedanke mich an dieser Stelle herzlich bei allen, die mich während der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

Hierbei gebührt mein besonderer Dank meiner Doktormutter, Frau PD Dr.-Ing. Antje Müller, die mir stets bei allen Anliegen zur Seite stand und mit ihrem Fachwissen maßgeblich zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen hat. Die von ihr angebrachten Anregungen sowie die konstruktive Kritik zeigten mir verschiedene Blickwinkel auf und ermöglichten so eine differenzierte und vielseitige Betrachtung der Thematik. Zudem bedanke ich mich für die fortwährende Hilfe bei der Planung und Auswertung der Versuche und für die Unterstützung bei der Anfertigung von Postern und Vorträgen.

Aus der Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie danke ich Frau Prof. Dr. med. Gabriela Riemekasten für das Ermöglichen des Projektes und die fortwährende Motivation und Unterstützung hierbei.

Frau Dr. med. Hanna Graßhoff, ebenfalls aus der Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie, danke ich für die stetige Unterstützung mit Fachwissen zu Patienten und verschiedenen rheumatologischen Fragestellungen.

Frau Gabriele Marschner und Frau Dr. rer. nat. Anja Schumann danke ich für die Einarbeitung in die Geräte des Labors der Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie sowie die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente. Aus diesem Labor danke ich darüber hinaus Frau Prof. Dr. med. Tanja Lange, Herrn Dr. rer. nat. Alexander Maximilian Hackel, Frau Dr. rer. nat. Sara Comdühr und Frau Silke Pitann für die Unterstützung bei spezifischen Fragestellungen.

Für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung meiner Daten danke ich aus dem Institut für Medizinische Biometrie und Statistik Herrn Dominik Thiele und Herrn Cesaire Joris Kuete Fouodo sowie Herrn Axel Künstler aus dem Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern dafür bedanken, dass sie mir dieses Studium ermöglicht und mich in allen Belangen stets unermüdlich unterstützt haben.