

Aus der Klinik mit Schwerpunkt
Rheumatologie und Klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Antibodies against chemokine receptors CXCR3 and CXCR4
predict progressive deterioration of lung function in patients with
systemic sclerosis

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Florian Weigold

aus Freiburg i. Br.

Datum der Promotion: 07.12.2018

Inhaltsverzeichnis

1. Abstrakt - Englisch	3
2. Abstrakt - Deutsch	4
3. Einleitung.....	5
4. Methoden	7
4.1. Datensammlung und Verarbeitung	7
4.2. SSc-Datenbank.....	7
4.3. Untersuchte Kollektive	7
4.4. Querschnittsanalyse	8
4.5. Längsschnittanalyse	9
4.6. Definition der SSc-ILD.....	9
4.7. Detektion der Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Ak	9
4.8. Durchflusszytometrie und Isolation von PBMC	10
4.9. Statistik	10
5. Ergebnisse.....	12
5.1. Anti-CXCR3 und Anti-CXCR4-Ak bei gesunden Spendern.....	12
5.2. Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Ak im SSc-Kollektiv	12
5.2.1. Verteilung der Anti-CXCR3/4-Ak-Konzentrationen.....	12
5.2.2. Anti-CXCR3/4-Ak als Marker für eine Lungenbeteiligung	13
5.2.3. Höhere Anti-CXCR3/4-Ak-Level als prädiktive Faktoren für eine stabile Lungenfunktion.....	14
5.2.4. Assoziationen der Anti-CXCR3/4-Ak mit weiteren klinischen Manifestationen, Nebenerkrankungen und Laborparametern.....	16
5.2.5. Die Proteinexpression von CXCR3/4 ist assoziiert mit Zeichen der Fibrose.....	17
6. Diskussion.....	19
7. Literaturverzeichnis	22
8. Eidesstattliche Versicherung.....	25
9. Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation	26
10. Auszug aus dem ISI Web of Knowledge.....	27
11. Originalpublikation	29
12. Supplement	39
13. Lebenslauf.....	43
14. Publikationsliste.....	44
15. Danksagung.....	45

1. Abstrakt - Englisch

Background

The chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 are involved in the pathogenesis of fibrosis, a key feature of systemic sclerosis (SSc). It is hypothesized that immunoglobulin (Ig)G antibodies (abs) against these two receptors are present in patients with SSc and are associated with clinical findings.

Methods

Anti-CXCR3 and anti-CXCR4 ab levels were measured in 449 sera from 327 SSc patients and in 234 sera from healthy donors (HD) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In SSc, ab levels were compared with clinical data in a cross-sectional and longitudinal setting. Protein expression of CXCR3 and CXCR4 on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was analyzed in 17 SSc patients and 8 HD by flow cytometry.

Results

Anti-CXCR3 and anti-CXCR4 ab levels were different among SSc subgroups compared with HD and were highest in diffuse SSc patients. The ab levels strongly correlated with each other ($r = 0.85$). Patients with SSc-related interstitial lung disease (SSc-ILD) exhibited higher ab levels which negatively correlated with lung function parameters (e.g., $r = -0.5$ and $r = -0.43$ for predicted vital capacity, respectively). However, patients with deterioration of lung function showed lower anti-CXCR3/4 ab levels compared to those with stable disease. Frequencies and median fluorescence intensities (MFI) of CXCR3⁺ and CXCR4⁺ PBMCs were lower in SSc patients compared with HD. They correlated with the severity of skin and lung fibrosis.

Conclusions

Anti-CXCR3/4 abs and their corresponding receptors are linked with the severity of SSc-ILD. Antibody levels discriminate patients with stable or decreasing lung function and could be used for risk stratification.

2. Abstrakt - Deutsch

Hintergrund

Die Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR4 sind involviert in die Pathogenese der Fibrose, einem Hauptmerkmal der systemischen Sklerose (SSc). Es wird angenommen, dass sich Immunglobulin (Ig)G Antikörper (Ak) gegen diese zwei Rezeptoren bei Patienten mit SSc nachweisen lassen und diese mit klinischen Merkmalen assoziiert sind.

Methoden

Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Ak-Konzentrationen wurden in 449 Seren von 327 SSc-Patienten sowie in 234 Seren von gesunden Spendern (HD) mittels "enzyme-linked immunosorbent assays" (ELISA) gemessen. Bei SSc-Patienten wurden die Ak-Level mit klinischen Merkmalen in einer Querschnitts- und einer Längsschnittsanalyse verglichen. Die Proteinexpression von CXCR3 und CXCR4 auf "peripheral blood mononuclear cells" (PBMCs) wurde mittels Durchflusszytometrie bei 17 SSc-Patienten und 8 gesunden Spendern analysiert.

Ergebnisse

Die Höhe der Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Ak-Spiegel unterschieden sich zwischen den SSc-Subgruppen und den gesunden Spendern. Sie waren am höchsten bei Patienten mit einer diffusen Form. Die Ak-Konzentrationen korrelierten stark miteinander ($r = 0.85$). Patienten mit einer SSc-induzierten interstitiellen Lungenfibrose (SSc-ILD) hatten erhöhte Ak-Konzentrationen. Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Ak wiesen negative Korrelationen mit verschiedenen Lungenfunktionsparametern (z.B. $r = -0.5$ und $r = -0.43$ bezüglich der Vitalkapazität) auf. Jedoch zeigten Patienten mit einer Verschlechterung der Lungenfunktion niedrigere Anti-CXCR3/4-Ak-Level als Patienten mit stabilen Werten.

Die Häufigkeiten und die medianen Fluoreszenzintensitäten (MFI) von CXCR3-positiven und CXCR4-positiven PBMCs waren bei SSc-Patienten im Vergleich mit gesunden Spendern erniedrigt und korrelierten mit dem Ausmaß der Haut- und Lungenfibrose.

Fazit

Es zeigte sich ein Zusammenhang zwischen Anti-CXCR3/4-Ak und ihren entsprechenden Rezeptoren mit dem Schweregrad der SSc-ILD. Über die Höhe der Ak-Spiegel konnte zwischen Patienten mit einer stabilen SSc-ILD und denen mit einer progredienten SSc-ILD unterschieden werden. Dies könnte zur Risikostratifizierung eingesetzt werden.

3. Einleitung

Die systemische Sklerose (SSc) ist eine schwere, durch Autoimmunität, Vaskulopathie und Fibrose geprägte, multisystemische Autoimmunerkrankung [1]. Die häufigste Todesursache als Folge der systemischen Sklerose ist die interstitielle Lungenerkrankung (SSc-ILD), welche durch Entzündung und Fibrose des intraalveolären Gewebes mit Aktivierung und Akkumulation von T-Zellen, Neutrophilen und Monozyten im betroffenen Gewebe verursacht wird [2–4].

Die genauen Krankheitsmechanismen sowie die Ätiologie der systemischen Sklerose sind noch nicht ausreichend verstanden. Die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen weisen jedoch auf einen Beitrag von Autoantikörpern innerhalb der Pathogenese hin. So konnte zuletzt gezeigt werden, dass Immunglobulin (Ig)G von Patienten mit systemischer Sklerose in C57BL-Mäusen eine interstitielle Lungenerkrankung und eine Vaskulopathie induzieren kann [5]. Weiter ließen sich Ak gegen den Angiotensin II Typ I Rezeptor (AT1R) und den Endothelin Rezeptor Type A (ETAR) bei einem Großteil der SSc-Patienten nachweisen. Die Höhe der Ak-Spiegel korrelierte mit mehreren Krankheitsmanifestationen und war prädiktiv für die SSc-assoziierte Mortalität [6]. Inzwischen ist bekannt, dass sich durch erhöhte Anti-AT1R- und Anti-ETAR-Ak-Level vaskuläre Komplikationen wie eine pulmonale arterielle Hypertonie (PAH) und digitale Ulzera (DU) vorhersagen lassen, nicht jedoch der Progress einer SSc-ILD [6–9].

In vitro konnte gezeigt werden, dass IgG von Patienten mit Anti-AT1R- und Anti-ETAR-Ak die Migration von T-Zellen und Neutrophilen fördert [5,10]. Weiter konnten Anti-AT1R- und Anti-ETAR-Ak die Produktion von verschiedenen Zytokinen, Ca²⁺ und Chemokinen induzieren, was unter Verwendung von AT1R- und Endothelin-Rezeptorblockern hemmbar war und somit die Spezifität der Ak aufzeigt [5–8,10,11].

Die Rezeptoren CXCR3 und CXCR4 sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), welche an der Migration von verschiedenen Zelltypen wie Lymphozyten, endothelialen Vorläuferzellen und Stammzellen beteiligt sind [12,13].

CXCR3 bindet an verschiedene proinflammatorische Chemokine und wird auf nativen T-Zellen nach Aktivierung von Interferon-gamma-induzierbaren Liganden in entzündetem Gewebe exprimiert. Es erfolgt so eine Rekrutierung von CXCR3-positiven T-Zellen, vornehmlich Th1-Zellen, zum Ort des Entzündungsgeschehens [14]. Weiter wird CXCR3 auf plasmazytoiden dendritischen Zellen und auf natürlichen Killerzellen (NK) exprimiert [14,15]. Eine erhöhte Anzahl von CXCR3-positiven Zellen wurde unter anderem bei der Lupusnephritis und in atherosklerotischen Läsionen beim systemischen Lupus erythematodes beobachtet [16,17].

CXCR4 ist ein spezifischer Rezeptor für den stromal cell-derived factor 1 (SDF-1, auch CXCL12 oder CXCL12 genannt), einem Molekül mit starker chemotaktischer Wirkung auf Lymphozyten und Neutrophile [15]. Ein Beitrag des CXCR4/SDF-1-Systems wird unter anderem diskutiert in der Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Ischämie/Reperfusionsschäden sowie der idiopathischen Lungenfibrose. Des Weiteren sind CXCR4-positive Zellen sowie die Chemokine CXCL11 und CXCL12 assoziiert mit pulmonalen Komplikationen bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen [18–21]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Höhe von CXCL11 in der bronchoalveolären Lavage von Patienten mit systemischer Sklerose ein prognostischer Faktor für die Entwicklung einer SSc-ILD ist [22].

Unter der Annahme der Existenz von Autoantikörpern gegen CXCR3 und CXCR4 bei SSc-Patienten wurde von unserer Gruppe ein „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) entwickelt, um deren Konzentrationen im Serum zu messen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit diesem Thema und mit der Frage, ob Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Ak als Marker für die systemische Sklerose bzw. für SSc-assoziierte Krankheitsmanifestationen dienen können.

4. Methoden

4.1. Datensammlung und Verarbeitung

Zunächst erfolgte zur strukturierten Speicherung und Verarbeitung der Datensätze die Programmierung einer Datenbank (SSc-Datenbank). Bis zum Zeitpunkt der Auswertung der Studie wurden in diese 880 Patienten mit insgesamt 1952 klinischen Charakterisierungen eingetragen.

Ein Großteil der klinischen Charakterisierungen lag bereits in Form von Assessmentbögen vor, diese reichten bis in das Jahr 1999 zurück. Ausgefüllt wurden die Formulare bei den entsprechenden Konsultationen der Patienten an der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und klinischer Immunologie an der Charité (Campus Mitte) durch den behandelnden Arzt. Die neueren Charakterisierungen wurden dann direkt bei Vorstellung des Patienten in die Datenbank eingetragen.

Weiter wurden die Ergebnisse von über 9000 serologischen Ak-bestimmungen in der Datenbank erfasst und den entsprechenden SSc-Patienten zugeordnet. Die Blutentnahme erfolgte in der Regel am Tag der Vorstellung, sodass größtenteils eine direkte Zuordnung von klinischer Charakterisierung und serologischen Ergebnissen möglich war.

Außerdem erfolgte die Messung von Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Ak von 234 gesunden Spendern.

4.2. SSc-Datenbank

Die Entwicklung der SSc-Datenbank erfolgte mit dem Programm Microsoft Access 2003. Die Grundlage bildet eine relationale Datenbank, die Benutzeroberfläche (GUI) wurde mit Hilfe von Formularen realisiert, die Programmierung erfolgte in „Visual Basic for Applications“ (VBA). Zur Vermeidung von Redundanzen und Anomalien wurde die relationale Datenbank nach den Regeln der Normalisierung von Relationen bis zur 3. Normalform entworfen. Die Eingabe von Daten durch die Benutzer erfolgt ausschließlich über Formulare. Die referentielle Integrität wurde durch Auswahlmenüs, entsprechende Algorithmen bei schreibenden Operationen und die Access-Datenbankengine sichergestellt.

4.3. Untersuchte Kollektive

Es wurden 327 Patienten mit systemischer Sklerose (SSc-Kollektiv) des Charité Universitätsklinikums Berlin untersucht. Alle Patienten haben schriftlich eingewilligt. Eine Genehmigung wurde durch die Ethikkommission des Charité Universitätsklinikums Berlin erteilt (EA1/042/09, EA1/013/05, EA1/160/10). Eine Charakterisierung des SSc-Kollektivs ist in **Table 1** dargestellt. Die Patienten wurden gemäß den Kriterien der EURSTAR und DNSS Netzwerke in

verschiedene Gruppen unterteilt (dSSc – „diffuse cutaneous systemic sclerosis“, lSSc – „limited cutaneous systemic sclerosis“, Overlap – „overlap syndromes“, UCTD – „undifferentiated connective tissue disease“) [1,23–27].

Eine Charakterisierung der 234 gesunden Spender (Normalkollektiv) ist in **Tabelle 2** zu finden.

Tabelle 1 Charakterisierung des SSc-Kollektivs

	SSc-Form				
	Gesamt	lSSc	dSSc	Overlap	UCTD
Geschlecht					
Weiblich	284(86.9)(100)	150(90.4)(58.8)	79(77.5)(27.8)	26(89.7)(9.2)	23(95.8)(8.1)
Männlich	43(13.1)(100)	16(9.6)(37.2)	23(22.5)(53.5)	3(10.3)(7.0)	1(4.2)(2.3)
Gesamt	327(100)(100)	166(100)(50.8)	102(100)(31.2)	29(100)(8.9)	24(100)(7.3)
Alter [Jahre]					
Alter [Jahre]	56.46±14,71	59.57±14.71	53.29±14.05	50.59±14.78	56.42±11.91
Manifestationsalter [Jahre]	48.43±15,75	50.48±14.55	45.25±14.92	44.29±14.21	51.69±12.73

Notation: Anzahl (% in Spalte) (% in Zeile)

Tabelle 2 Geschlecht und Alter der Normalspender

Geschlecht	N(%)	Mittelwert (Jahre) ±SD	Minimum (Jahre)	Maximum (Jahre)
Gesamt	234(100)	36.62±12.81	18	66
Männlich	160(68.4)	38.45±16.26	18	65
Weiblich	74(31.6)	32.66±13.16	18	66

4.4. Querschnittsanalyse

In der Querschnittsanalyse wurden 449 Seren von 327 Patienten bezüglich Anti-CXCR3-Ak sowie 425 Seren von 312 Patienten des oben genannten SSc-Kollektivs bezüglich Anti-CXCR4-Ak untersucht. Lagen zu einem Patienten mehrere Charakterisierungen vor, wurde nur die zuletzt erhobene betrachtet. Die mittlere Zeit zwischen dem Manifestationsalter und der Bestimmung der Ak-Spiegel betrug für Anti-CXCR3 8.5 ± 6.9 Jahre und für Anti-CXCR4 8.4 ± 6.9 Jahre. Bei der Untersuchung der Komorbiditäten wurden nur solche berücksichtigt, welche mindestens bei 10 verschiedenen Patienten dokumentiert waren.

In der Querschnittsanalyse für Anti-CXCR3 hatten 35% der Patienten eine bekannte SSc-ILD, 23% davon einen schweren Verlauf mit einer forcierten expiratorischen Vitalkapazität (FVC) < 70%. In der Querschnittsanalyse für Anti-CXCR4 hatten 33% eine bereits diagnostizierte SSc-ILD, 31% davon eine FVC < 70%.

4.5. Längsschnittanalyse

Es wurden Patienten in die Längsschnittanalyse eingeschlossen, bei denen ein Follow-Up von mindestens 3 Jahren nach der ersten Charakterisierung/Ak-Messung vorlag.

Die Patienten wurden je nach Lungenfunktionsparameter (FVC, FEV1 – Einsekundenkapazität, TLC – totale Lungenkapazität, DLCO-SB – Diffusionskapazität für Kohlenmonoxid, DLCO/VA) gruppiert, in solche mit einer Verschlechterung > 10% innerhalb des dreijährigen Beobachtungszeitraums gegenüber eines Ausgangswertes und in solche mit einer stabilen Lungenfunktion. Die Bestimmung der Anti-CXCR3/4-Ak erfolgte zu Beginn des Beobachtungszeitraums.

Die Bestimmung der optimalen Cut-off-Werte für die Ak-Konzentrationen, die am besten zwischen stabiler und fortschreitender SSc-ILD diskriminieren, wurde mittels ROC-Analyse (Youden's-Index) durchgeführt. Für die bessere klinische Verwendbarkeit wurde nicht für jeden Lungenfunktionsparameter ein separater Trennwert angegeben, sondern der Median der erhaltenen Cut-off-Werte für alle Lungenfunktionsparameter verwendet (6.2 U für Anti-CXCR3 und 5.18 U für Anti-CXCR4).

4.6. Definition der SSc-ILD

Die SSc-ILD wurde gemäß den Kriterien des Deutschen Netzwerks für Systemische Sklerose definiert. Demensprechend wurde die Diagnose SSc-ILD gestellt, wenn im Röntgen bzw. HRCT eine bilaterale basale Fibrose sichtbar war und in den Lungenfunktionstests eine restriktive Lungenfunktionsstörung mit einer FVC < 80% vorlag. Quantitative Analysen mittels HRCT wurden in der klinischen Routine, insbesondere bei Patienten mit einer limitierten Form, positiven Anti-Zentromer-Ak sowie normaler Lungenfunktion, nicht regelhaft durchgeführt.

4.7. Detektion der Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Ak

Die Messung der Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-IgG-Ak erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen ELISA (CellTrend GmbH Luckenwalde, Germany). Es wurden jeweils doppelte Serumproben mit einer Verdünnung von 1:100 bei 4°C für 2 Stunden inkubiert. Mit Hilfe der Standardkurve einer verdünnten Positivkontrolle wurden die Konzentrationen der spezifischen Ak als arbitrary units (AU oder verkürzt U) bestimmt. Bei der Messung waren die Serumproben anonymisiert, eine Zuordnung zu den klinischen Charakterisierungen war nicht möglich.

4.8. Durchflusszytometrie und Isolation von PBMC

Es wurden die PBMC's (peripheral blood mononuclear cells) von 17 Patienten mit systemischer Sklerose (jeweils acht Patienten mit dSSc und lSSc, ein Patient mit Overlap-Syndrom) sowie von acht gesunden Spendern auf die Proteinexpression von CXCR3 und CXCR4 mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Die PBMC's wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll-Paque) gewonnen, die Identifizierung erfolgte über ihre CD-Antigene (CD4 = T-Helferzellen, CD8 = zytotoxische T-Zellen, CD19 = B-Zellen, CD14 = Monozyten). Fixiert wurde in 4% Paraformaldehyd.

Die Durchflusszytometrie erfolgte mit einem Gerät der Firma BD Biosciences (LSR II), die Analyse mit der Software FlowJo (TreeStar, Ashland, OR, USA). Die Häufigkeiten wurden mittels der entsprechenden Isotypkontrolle normalisiert. Für den Median der Fluoreszenzintensität (MFI) wurde das Verhältnis zwischen dem MFI der markierten Zellen und dem MFI der Isotypkontrolle berechnet.

Folgende Ak wurden verwendet: Mouse IgG anti-human CD3 cyanin 5 (clone UCHT-1) and mouse IgG anti-human CD14 Alexa 700 (clone TM1) bezogen vom Deutschen Rheuma-Forschungszentrum (DRFZ, Berlin). Mouse IgG anti-human CD4 allophycocyanin-cyanin 7 (clone RPA-T4, cat. No. 300518), mouse IgG anti-human CD183 (CXCR3) Alexa 488 (clone G025H7, cat. no. 353710) and the respective isotype control mouse IgG1 Alexa 488 (clone MOPC-21, cat. no. 400129), mouse IgG anti-human CD184 (CXCR4) phycoerythrin (clone 12G5, cat. no. 306506) and the respective isotype control mouse IgG2a phycoerythrin (MOPC-173, cat. no. 400212) bezogen von der Firma Biolegend (San Diego, CA, USA).

4.9. Statistik

Die Statistik wurde größtenteils mit dem Programm IBM SPSS Version 20 durchgeführt. Assoziationen zwischen kategorialen Daten wurden mittels Chi-Quadrat-Test oder Fisher's exact Test analysiert. Nichtkategoriale, nicht-normalverteilte Daten wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis Test mit Dunn-Bonferroni post-hoc Test's, Mann-Whitney's-U Test und Spearman's rho untersucht. Receiver operating characteristic (ROC)-Analysen (Youden's-Index) wurden zur Identifizierung der optimalen Cut-off-Werte eingesetzt, zur Trennung zwischen stabiler und fortschreitender SSc-ILD.

Zur Analyse der prädiktiven Wertigkeit der Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Ak hinsichtlich einer Verschlechterung der Lungenfunktionsparameter in der Längsschnittanalyse wurden der Log-rank Test und das Cox proportional hazards model verwendet. Die Statistik im Zusammenhang mit der

Auswertung der Rezeptorexpressionen wurde mit Hilfe der Software Prism5 (GraphPad Inc., La Jolla, USA) durchgeführt.

5. Ergebnisse

5.1. Anti-CXCR3 und Anti-CXCR4-Ak bei gesunden Spendern

Im untersuchten Normalkollektiv mit gesunden Probanden betrug der mediane Anti-CXCR3-Ak-Spiegel 3.45 (CI95%: 2.9 – 3.8) U, das 95. Perzentil lag bei 10.61 U. Der mediane Anti-CXCR4-Ak-Spiegel lag bei 2.74 (CI95%: 2.51 – 2.98) U, das 95. Perzentil bei 7.42 U. Weitere Perzentile siehe **Tabelle 3**. Die Angabe des 5. Perzentils ist aufgrund der Lage vieler Werte an der Grenze des unteren Messbereiches (1.25 U) nicht sinnvoll. Weder bei den Anti-CXCR3-Ak noch bei den Anti-CXCR4-Ak lag eine Normalverteilung der Werte vor (Kolmogorov-Smirnov-Test $p \leq 0.001$, Shapiro-Wilk-Test $p \leq 0.001$). Weiter existierte eine schwache positive Korrelation mit dem Alter (Anti-CXCR3: $r = 0.131$, $p \leq 0.05$; Anti-CXCR4: $r = 0.158$, $p \leq 0.05$), zwischen den Geschlechtern unterschieden sich die Werte nicht.

Tabelle 3 Anti-CXCR3 und Anti-CXCR4-Ak-Perzentile bei Normalspendern

Perzentile	5	10	25	50	75	90	95
Anti-CXCR3 [U]		1.41	2.13	3.46	5.40	8.04	10.61
Anti-CXCR4 [U]		1.47	1.90	2.74	4.02	5.87	7.42

Wie in **Abbildung 1** dargestellt, existierte im Normalkollektiv eine starke Korrelation zwischen Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Ak-Konzentrationen ($r = 0.885$, $p \leq 0.001$, $n = 198$).

5.2. Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Ak im SSc-Kollektiv

5.2.1. Verteilung der Anti-CXCR3/4-Ak-Konzentrationen

Der mediane Anti-CXCR3-Ak-Spiegel betrug 3.8 (CI95%: 3.2 – 4.2) U, das 95. Perzentil lag bei 10.61 U. Der Median der Anti-CXCR4-Werte lag bei 3.3 (CI95%: 3 – 3.8) U, das 95. Perzentil bei 7.42 U. Weitere Perzentile sind in **Tabelle 4** aufgeführt.

Tabelle 4 Anti-CXCR3- und anti-CXCR4-Ak-Perzentile im SSc-Kollektiv

Perzentile	5	10	25	50	75	90	95
Anti-CXCR3 [U]	1.34	1.48	2.14	3.80	6.51	12.87	20.00
Anti-CXCR4 [U]	1.29	1.58	2.06	3.29	5.88	10.02	19.25

Im Vergleich mit gesunden Spendern war bezüglich der Höhe der Anti-CXCR3-Ak-Level kein signifikanter Unterschied festzustellen, die Anti-CXCR4-Ak-Level hingegen waren im SSc-Kollektiv signifikant erhöht (3.3 vs. 2.7 U, $p \leq 0.001$). Über der 95. Perzentile von gesunden

Spendern lagen im SSc-Kollektiv 12.2% der Anti-CXCR3- und 17.2% der Anti-CXCR4-Ak-Spiegel.

Wie auch im Normalkollektiv zeigte sich eine starke Korrelation der Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Ak-Konzentrationen untereinander ($r = 0.85$, $p \leq 0.001$, $n = 312$, siehe **Abbildung 1**).

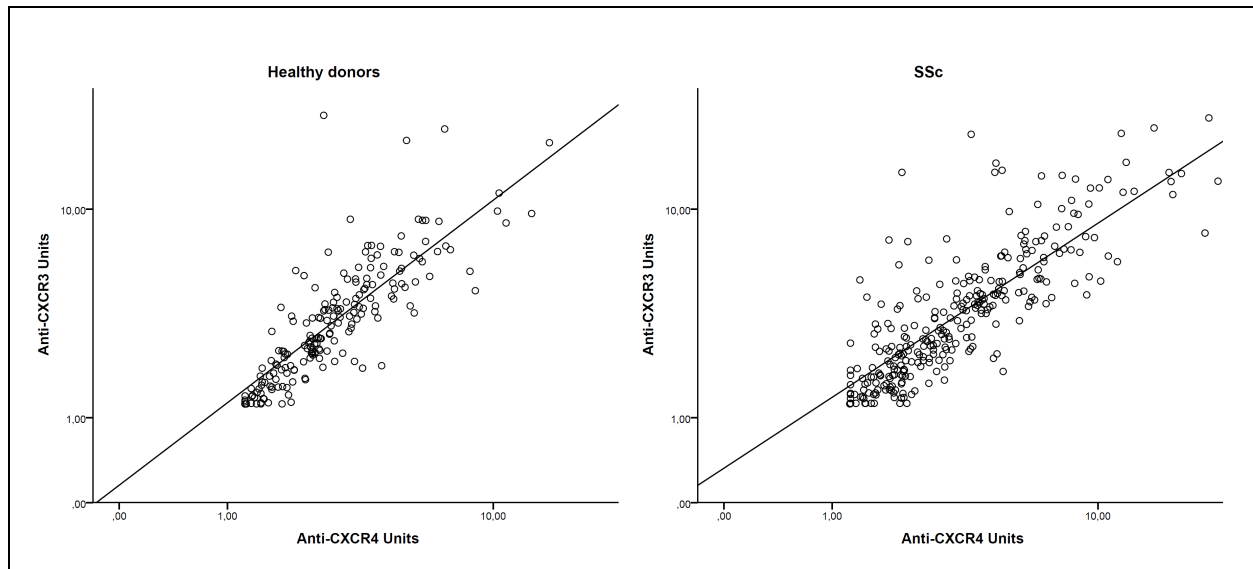


Abbildung 1 Korrelationen der Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Ak-Konzentrationen untereinander bei gesunden Spendern und im SSc-Kollektiv

Schwache negative Korrelationen waren sowohl für Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Ak zu finden mit dem Alter zum Zeitpunkt der Blutentnahme ($r = -0.2$, $p \leq 0.001$ und $r = -0.2$, $p \leq 0.001$) und mit dem Alter bei Erstdiagnose ($r = -0.24$, $p \leq 0.001$ und $r = -0.27$, $p \leq 0.001$).

Ein Vergleich der verschiedenen Gruppen innerhalb des SSc-Kollektivs ergab, dass Patienten mit der diffusen Form (dSSc) höhere Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Ak-Level aufwiesen als Patienten mit der limitierten Form (lSSc, $p \leq 0.001$, $p \leq 0.05$) und gesunde Spender ($p \leq 0.001$, $p \leq 0.001$). 17.6% der Patienten mit einer dSSc hatten ein Anti-CXCR3-Ak-Spiegel über der 95. Perzentile von gesunden Spendern, bezüglich Anti-CXCR4 waren es 25.5%.

5.2.2. Anti-CXCR3/4-Ak als Marker für eine Lungenbeteiligung

In der Querschnittsanalyse zeigten Patienten mit bereits diagnostizierter SSc-ILD leicht erhöhte Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Ak-Konzentrationen verglichen mit Patienten ohne eine bekannte interstitielle Lungenerkrankung (3.4 vs. 4.1 U, $p \leq 0.05$ und 3.1 vs. 3.9 U, $p \leq 0.05$). Weiter waren mehrere negative Korrelationen beider Ak mit verschiedenen Lungenfunktionsparametern festzustellen (siehe **Tabelle 5**), welche darauf hindeuten, dass

erhöhte Anti-CXCR3- bzw. Anti-CXCR4-Ak-Spiegel mit einer kompromittierten Lungenfunktion einhergehen.

Table 5 Korrelationen zwischen Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Ak-Spiegeln mit Lungenfunktionsparametern von Patienten mit systemischer Sklerose.

Lungenfunktionsparameter	Anti-CXCR3			Anti-CXCR4		
	<i>r</i>	<i>p</i> -Werte	n	<i>r</i>	<i>p</i> -Werte	n
VC (%)	- 0.50	≤ 0.001	71	-0.43	≤ 0.001	58
FVC (%)	-0.27	≤ 0.001	284	-0.2	≤ 0.001	271
TLC (%)	-0.25	≤ 0.001	253	-0.21	≤ 0.001	240
DLCO-SB (%)	-0.32	≤ 0.01	274	-0.26	≤ 0.05	64
DLCO/VA (%)	-0.20	= 0.08	245	-0.16	= 0.20	64
FEV1 (%)	- 0.18	≤ 0.01	278	-0.17	≤ 0.01	265
FEV1/VC (%)	+0.25	≤ 0.05	71	+ 0.2	= 0.13	58

5.2.3. Höhere Anti-CXCR3/4-Ak-Level als prädiktive Faktoren für eine stabile Lungenfunktion

Interessanterweise stellte sich bereits in der Querschnittsanalyse heraus, dass in der Gruppe der Patienten mit einer bekannten SSc-ILD, solche mit einem schweren Verlauf, d.h. mit einer FVC < 70%, niedrigere Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Ak-Level aufwiesen als Patienten mit einer FVC > 70% (2.9 vs. 4.8 U, $p \leq 0.01$, $n = 82$ und 2.8 vs. 5.0 U, $p \leq 0.05$, $n = 78$).

Passend hierzu kristallisierte sich in der Längsschnittanalyse heraus, dass Patienten mit einem niedrigen Anti-CXCR3- oder Anti-CXCR4-Ak-Wert zu Beginn der dreijährigen Follow-Up-Periode, signifikant häufiger eine Verschlechterung der Lungenfunktion aufwiesen als die Patienten mit höheren Ak-Werten (siehe *Table 6, Abbildung 2*).

Tabelle 6 Höhere Ak-Level sind assoziiert mit einer stabilen Lungenfunktion

Parameter	Patienten oberhalb des cut-off's (%)		Patienten unterhalb des cut-off's (%)		P-Werte	Anzahl Patienten (n)	Hazard ratios
	Ver-schlechterung $\geq 10\%$	Keine Ver-schlechterung	Ver-schlechterung $\geq 10\%$	Keine Ver-schlechterung			
Anti-CXCR3							
FVC (%)	25.0	75.0	59.3	40.7	≤ 0.01	59	0.32
FEV1 (%)	23.5	76.5	71.1	28.9	≤ 0.001	72	0.22
DLCO-SB (%)	36.4	63.6	63.6	36.4	≤ 0.05	55	0.47
DLCO/VA (%)	42.4	57.6	70.4	29.6	≤ 0.05	60	0.38
Anti-CXCR4							
FVC (%)	22.2	77.8	70.0	30.0	≤ 0.001	47	0.2
FEV1 (%)	33.3	66.7	78.6	21.4	≤ 0.001	61	0.27
TLC (%)	33.3	66.7	64.7	35.3	≤ 0.05	44	0.33
DLCO-SB (%)	43.3	56.7	75.0	25.0	≤ 0.05	46	0.46
DLCO/Va (%)	39.4	60.6	82.4	17.6	≤ 0.001	50	0.24

So zeigten nach 12 Monaten 44% der Patienten mit einem Anti-CXCR3-Ak-Spiegel unter 6.2 U eine Verschlechterung der FVC-Werte $> 10\%$, jedoch nur 13% der Patienten, welche einen Spiegel über 6.2 U aufwiesen. Ähnliches konnte nach 24 (56% vs. 19%) und nach 36 Monaten (59% vs. 25%) beobachtet werden. Baseline-Adjustierungen für den Ausgangswert der Lungenfunktion sowie für Alter und Geschlecht der Patienten zeigten keine signifikanten Einflüsse auf diese Ergebnisse.

Noch besser konnten Anti-CXCR4-Ak eine Verschlechterung der FVC $> 10\%$ vorhersagen. Hier zeigten nach 12 Monaten 55% der Patienten mit einem Wert < 5.18 U eine Verschlechterung, jedoch nur 11% der Patienten mit einem Wert über diesem Cut-Off. Gleiches zeigte sich nach 24 (70% vs. 15%) und 36 Monaten (70% vs. 22%).

Ähnliche Ergebnisse ergaben die Untersuchungen für weitere Lungenparameter (siehe **Tabelle 6**).

Insgesamt zeigte sich somit, dass niedrige Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Ak-Konzentrationen als prädiktive Faktoren für eine Verschlechterung der Lungenfunktion dienen können.

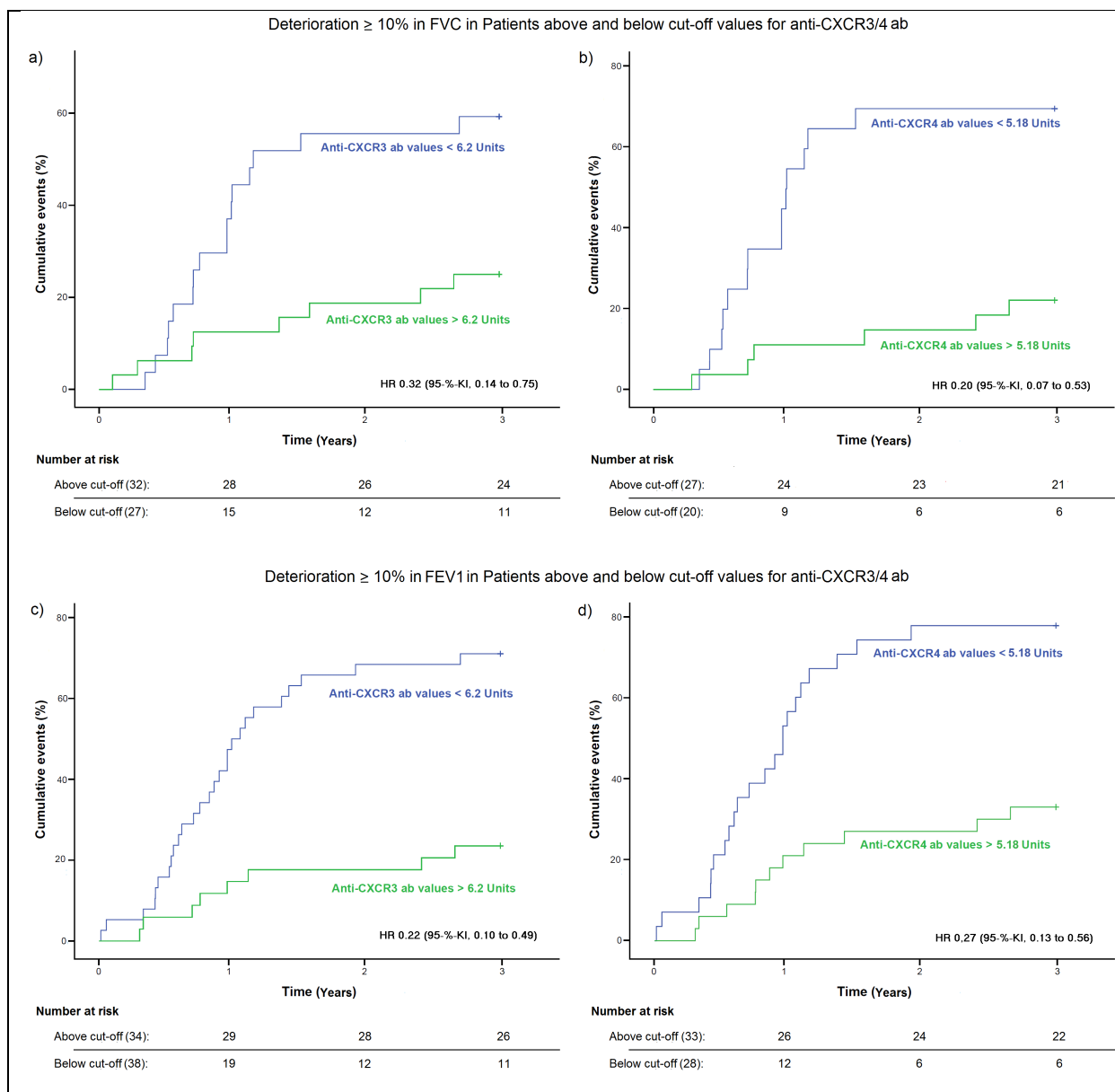


Abbildung 2 Darstellung der prädiktiven Wertigkeit von Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Ak bezüglich einer Verschlechterung der FVC und der FEV1 $> 10\%$ innerhalb von 3 Jahren anhand von kumulativen Ereignissen

5.2.4. Assoziationen der Anti-CXCR3/4-Ak mit weiteren klinischen Manifestationen, Nebenerkrankungen und Laborparametern

Innerhalb des SSc-Kollektivs war ein erhöhter Anti-CXCR3-Ak-Spiegel bei Patienten mit Muskelschwäche (4.2 vs. 3.4 U, $p \leq 0.05$, $n = 321$) festzustellen, weiter waren Anti-CXCR3-Ak-Werte über der 95. Perzentile von Normal Spendern assoziiert mit Gelenkbeschwerden ($p \leq 0.05$, $n = 327$) und der Diagnose einer Osteoarthritis ($p \leq 0.05$, $n = 373$). Bei Patienten mit einer Proteinurie waren die Anti-CXCR3-Ak deutlich erniedrigt (1.8 vs. 3.9 U, $p \leq 0.01$, $n = 321$).

Bezüglich Anti-CXCR4-Ak zeigten sich innerhalb des SSc-Kollektivs erhöhte Werte bei Patienten mit Muskelschwäche (3.4 vs. 3.1 U, $p \leq 0.05$, $n = 306$) und Muskelschmerzen (4.8 vs. 3.1 U, $p \leq 0.05$, $n = 187$). Ein hoher Ak-Spiegel, über der 95. Perzentile von gesunden Spendern, war assoziiert mit kardialen Arrhythmien, Herzinsuffizienz und kardiovaskulären Erkrankungen ($p \leq 0.05$, $n = 263$). Signifikant niedrigere Anti-CXCR4-Ak-Konzentrationen wiesen Patienten mit einem sekundären Sjögren-Syndrom auf (2.3 vs. 3.7 U, $p \leq 0.05$, $n = 263$).

Keinen Zusammenhang zwischen der Höhe der Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Ak-Level konnte mit der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF), dem modifizierten Rodnan Skin Score (mRSS) sowie dem mittleren und dem systolischen pulmonalarteriellen Druck (mPAP bzw. sPAP) nachgewiesen werden.

Weiter bestand eine schwache Korrelation zwischen der Anti-CXCR3-Ak-Konzentration und der Blutsenkungsgeschwindigkeit ($r = 0.16$, $p \leq 0.05$, $n = 251$). Bezüglich des C-reaktiven Proteins (CRP) konnte für beide Ak kein Zusammenhang mit der Höhe der Spiegel gefunden werden.

Darüber hinaus hatten Anti-Topoisomerase I Ak-positive Patienten leicht erhöhte Anti-CXCR3-Ak im Vergleich mit Anti-Topoisomerase I Ak-negativen Patienten (4.7 vs. 4.1 U, $p \leq 0.05$, $n = 252$). Für Anti-CXCR4-Ak wurden hier keine Unterschiede festgestellt.

5.2.5. Die Proteinexpression von CXCR3/4 ist assoziiert mit Zeichen der Fibrose

Da das Vorhandensein der Antikörper möglicherweise abhängig ist von der Rezeptorexpression, wurde diese ebenfalls gemessen. Hierzu wurden PBMC's von Patienten mit systemischer Sklerose und gesunden Spendern mittels Durchflusszytometrie untersucht. Es zeigte sich, dass der Anteil an Monozyten, CD8-positiven T-Zellen und B-Zellen, welche CXCR3 bzw. CXCR4 exprimieren, bei Patienten mit systemischer Sklerose signifikant niedriger ist als bei gesunden Spendern. Ebenso zeigten sich signifikant reduzierte MFI's bezüglich CXCR3 und CXCR4 bei den oben genannten Zelltypen im Vergleich mit gesunden Spendern.

Für CD14-positive Monozyten konnte gezeigt werden, dass der Anteil an CXCR3-exprimierenden Zellen sowie auch deren MFI negative Korrelationen mit der FVC der entsprechenden SSc-Patienten aufweisen ($r = -0.5$, $p \leq 0.05$ und $r = -0.5$, $p \leq 0.05$).

Weiter konnte eine positive Korrelation der MFI von CXCR4-positiven, CD4-positiven T-Zellen mit dem modifizierten Rodnan skin score (mRSS) nachgewiesen werden ($r = 0.6$, $p \leq 0.01$). Ebenso zeigten sich positive Korrelationen zwischen der MFI von CXCR4-positiven Monozyten und der Zeit seit Beginn des Raynaud-Phänomens ($r = 0.53$, $p \leq 0.05$), der Zeit

seit Beginn der Hautfibrose ($r = 0.52, p \leq 0.05$) sowie der Zeit seit der ersten Organmanifestation ($r = 0.54, p \leq 0.05$).

6. Diskussion

In dieser Arbeit wurden erstmals Antikörper gegen die Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR4 bei Patienten mit systemischer Sklerose untersucht und mit gesunden Spendern verglichen.

Das Hauptergebnis ist die Identifizierung eines Zusammenhangs zwischen den untersuchten Ak und dem Vorliegen sowie dem Verlauf einer SSc-ILD.

Patienten mit einer SSc-ILD hatten höhere Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Ak-Konzentrationen als solche ohne eine interstitielle Lungenerkrankung. Weiter zeigten Patienten mit einer diffusen Form höhere Ak-Level als solche mit einer limitierten Form und gesunde Spender.

Mehrere Lungenfunktionsparameter im SSc-Kollektiv wiesen schwache negative Korrelationen mit beiden AK auf. Im Gegensatz hierzu konnte in der Längsschnittanalyse gezeigt werden, dass niedrige Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Ak-Werte prädiktive Faktoren hinsichtlich einer Verschlechterung der Lungenfunktion sind. Passend hierzu zeigte sich, dass Patienten mit einer schweren SSc-ILD (FVC < 70%) signifikant niedrigere Ak-Spiegel aufwiesen als solche mit einer leichteren Verlaufsform (FVC > 70%).

Erhöhte Ak-Level bei Patienten mit SSc-ILD auf der einen sowie eine Verbindung von hohen Ak-Konzentrationen mit einem verminderten Voranschreiten der interstitiellen Lungenerkrankung auf der anderen Seite scheinen auf den ersten Blick widersprüchlich. Ähnliche Beobachtungen wurden jedoch in der Vergangenheit auch hinsichtlich regulatorischer T-Zellen (Treg) beim systemischen Lupus erythematodes (SLE) gemacht. Einerseits korrelierten diese stark mit der Krankheitsaktivität beim SLE [28], was zunächst auf eine pathogene Rolle der Zellen hindeutete. Andererseits zeigten Untersuchungen, dass sich eine Anreicherung von regulatorischen T-Zellen positiv auf die Aktivität des Lupus auswirkte und somit den Treg's nicht unbedingt eine pathogene Rolle zuzuschreiben war [28]. Analog hierzu könnte die verminderte Progression der SSc-ILD bei Patienten mit hohen Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Ak auch Hinweis auf eine protektive Wirkung der Ak sein.

Untersuchungen bezüglich der Rezeptorexpression von CXCR3 und CXCR4 auf PBMC's ergaben positive Korrelationen mit dem Ausmaß der Haut- und Lungenfibrose bei SSc-Patienten. Weiter war der Anteil der CXCR3- und CXCR4-positiven T-Zellen, B-Zellen und Monozyten im Serum im Vergleich mit gesunden Spendern erniedrigt, was Zeichen einer reduzierten Zellaktivierung, einer Downregulation der Rezeptorexpression aufgrund von chronischer Stimulation oder einer Migration der Zellen aus der Blutbahn in das Gewebe sein könnte. In der Literatur sind sowohl normwertige, erniedrigte und auch erhöhte Anteile CXCR3-positiver Zellen

bei Patienten mit systemischer Sklerose beschrieben [29–31] sowie eine Hochregulation von CXCR4 und SDF-1 in der Haut von Patienten mit früher systemischer Sklerose [32].

Frühere Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass Anti-AT1R- und Anti-ETAR-Ak eine wichtige Rolle bei der Migration von Zellen bei Patienten mit SSc spielen [5,7]. So korreliert die Zellmigration mit den Leveln an Anti-AT1R- und Anti-ETAR-Ak, diese verhalten sich gegenüber den entsprechenden Rezeptoren agonistisch und stimulierend [5,7].

Analog hierzu konnte für IgG von SSc-Patienten mit hohen Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Ak-Konzentrationen in Experimenten mit spezifischen Rezeptorblockern nachgewiesen werden, dass über CXCR3 (und wahrscheinlich auch über CXCR4) ebenfalls eine Zellmigration vermittelt werden kann (siehe „Supplemental Material and Methods“ der Originalpublikation).

Partielle Sequenzidentitäten zwischen CXCR3 und CXCR4 sowie zwischen Anti-CXCR4- und Anti-AT1R-Ak wurden im Vorfeld beschrieben [33,34], weiter konnten wir eine moderate Korrelation der Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Ak-Konzentrationen mit den Leveln an Anti-AT1R- und Anti-ETAR-Ak zeigen. Dementsprechend ist auch an eine Beeinflussung der genannten, über Anti-AT1R/ETAR-Ak vermittelten Effekte auf die Zellmigration durch Anti-CXCR3/4-Ak zu denken.

Unsere Studie hat einige Limitationen, welche auch in zukünftigen Arbeiten weiter untersucht werden sollten. So ermittelten wir nicht den Einfluss von immunmodulierenden Medikamenten auf die Ergebnisse. Ebenso war die prädiktive Wertigkeit der Ak auf die Mortalität sowie Untersuchungen von Patienten mit anderen Erkrankungen nicht Teil dieser Arbeit.

Weiter wurden die Daten in klinischen Routineuntersuchungen erhoben und sind daher nicht immer vollständig. Aufgrund der späteren Entwicklung des Anti-CXCR4-ELISA's wurde nicht bei allen Patienten der Anti-CXCR4-Ak-Wert bestimmt. Die Quantifizierung der SSc-ILD erfolgte über Lungenfunktionsuntersuchungen als Surrogatparameter, da regelmäßige CT-Untersuchungen nicht zur klinischen Routine gehörten.

Zusammenfassend haben wir in unserer Studie eine Verbindung zwischen Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Ak-Konzentrationen im Serum mit dem Vorliegen und dem Verlauf einer SSc-ILD bei Patienten mit systemischer Sklerose dargestellt.

Es wurde gezeigt, dass die Höhe der Anti-CXCR3- und Anti-CXCR4-Ak-Level prädiktive Faktoren hinsichtlich des Verlaufs einer SSc-ILD sind, mit deren Hilfe man Patienten mit einer stabilen SSc-ILD von denen mit einer progredienten SSc-ILD unterscheiden kann. Ein klinischer Einsatzbereich wäre somit beispielsweise die Risikostratifizierung von SSc-Patienten.

Insgesamt weisen die Ergebnisse dieser Arbeit, aufgrund von signifikanten Veränderungen der Ak-Level und der Rezeptorexpression bei Patienten mit systemischer Sklerose gegenüber gesunden Spendern, auf ein gestörtes CXCR3/CXCR4-System als Teil der Pathogenese der systemischen Sklerodermie hin, was in zukünftigen Studien weiterführend untersucht werden sollte.

7. Literaturverzeichnis

1. Carwile LeRoy E, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA, Wollheim F. Scleroderma (systemic sclerosis): Classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol.* 1988;15:202–5.
2. Tyndall AJ, Bannert B, Vonk M, Airo P, Cozzi F, Carreira PE, Bancel DF, Allanore Y, Muller-Ladner U, Distler O, Iannone F, Pellerito R, Pileckyte M, Miniati I, Ananieva L, Gurman AB, Damjanov N, Mueller A, Valentini G, et al. Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. *Ann Rheum Dis.* 2010;69:1809–15.
3. Steen VD, Medsger TA. Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972-2002. *Ann Rheum Dis.* 2007;66:940–4.
4. Khanna D, Tseng CH, Farmani N, Steen V, Furst DE, Clements PJ, Roth MD, Goldin J, Elashoff R, Seibold JR, Saggarr R, Tashkin DP. Clinical course of lung physiology in patients with scleroderma and interstitial lung disease: Analysis of the Scleroderma Lung Study Placebo Group. *Arthritis Rheum.* 2011;63:3078–85.
5. Kill A, Tabeling C, Undeutsch R, Kühl AA, Günther J, Radic M, Becker MO, Heidecke H, Worm M, Witzernath M, Burmester G-R, Dragun D, Riemekasten G. Autoantibodies to angiotensin and endothelin receptors in systemic sclerosis induce cellular and systemic events associated with disease pathogenesis. *Arthritis Res Ther.* 2014;16:R29.
6. Riemekasten G, Philippe A, Näther M, Slowinski T, Müller DN, Heidecke H, Matucci-Cerinic M, Czirják L, Lukitsch I, Becker M, Kill A, van Laar JM, Catar R, Luft FC, Burmester GR, Hegner B, Dragun D. Involvement of functional autoantibodies against vascular receptors in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2011;70:530–6.
7. Becker MO, Kill A, Kutsche M, Guenther J, Rose A, Tabeling C, Witzernath M, Kuhl AA, Heidecke H, Ghofrani HA, Tiede H, Schermuly RT, Nickel N, Hoepfer MM, Lukitsch I, Gollasch M, Kuebler WM, Bock S, Burmester GR, et al. Vascular receptor autoantibodies in pulmonary arterial hypertension associated with systemic sclerosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;190:808–17.
8. Günther J, Rademacher J, van Laar JM, Siegert E, Riemekasten G. Functional autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin Immunopathol.* 2015;37:529–42.
9. Avouac J, Riemekasten G, Meune C, Ruiz B, Kahan A, Allanore Y. Autoantibodies against endothelin 1 Type A receptor are strong predictors of digital ulcers in systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2015;42:1801–7.
10. Günther J, Kill A, Becker MO, Heidecke H, Rademacher J, Siegert E, Radić M, Burmester G-R, Dragun D, Riemekasten G. 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.* 2014;16:R65.
11. Rademacher J, Kill A, Mattat K, Dragun D, Siegert E, Günther J, Riemekasten G. Monocytic angiotensin and endothelin receptor imbalance modulate secretion of the profibrotic chemokine ligand 18. *J Rheumatol.* 2016;43:587–91.
12. Groom JR, Luster AD. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol Cell Biol.* 2011;89:207–15.
13. Murdoch C. CXCR4: chemokine receptor extraordinaire. *Immunol Rev.* 2000;177:175–84.
14. Lacotte S, Brun S, Muller S, Dumortier H. CXCR3, inflammation, and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2009. p. 310–7.
15. Hummel S, Van Aken H, Zarbock A. Inhibitors of CXC chemokine receptor type 4: putative therapeutic approaches in inflammatory diseases. *Curr Opin Hematol.* 2014;21:29–36.
16. Enghard P, Humrich JY, Rudolph B, Rosenberger S, Biesen R, Kuhn A, Manz R, Hiepe F, Radbruch A, Burmester GR, Riemekasten G. CXCR3+CD4+ T cells are enriched in inflamed

- kidneys and urine and provide a new biomarker for acute nephritis flares in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum.* 2009;60:199–206.
17. Clement M, Charles N, Escoubet B, Guedj K, Chauveheid MP, Caligiuri G, Nicoletti A, Papo T, Sacre K. CD4+CXCR3+ T cells and plasmacytoid dendritic cells drive accelerated atherosclerosis associated with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun.* 2015;63:59–67.
 18. Tourkina E, Bonner M, Oates J, Hofbauer A, Richard M, Znoyko S, Visconti RP, Zhang J, Hatfield CM, Silver RM, Hoffman S. Altered monocyte and fibrocyte phenotype and function in scleroderma interstitial lung disease: reversal by caveolin-1 scaffolding domain peptide. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2011;4:15.
 19. Andersson-Sjoland A, de Alba CG, Nihlberg K, Becerril C, Ramirez R, Pardo A, Westergren-Thorsson G, Selman M. Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40:2129–40.
 20. Costello CM, McCullagh B, Howell K, Sands M, Belperio JA, Keane MP, Gaine S, McLoughlin P. A role for the CXCL12 receptor, CXCR7, in the pathogenesis of human pulmonary vascular disease. *Eur Respir J.* 2012;39:1415–24.
 21. Antoniou KM, Soufla G, Lymbouridou R, Economidou F, Lasithiotaki I, Manousakis M, Drositis I, Spandidos DA, Siafakas NM. Expression analysis of angiogenic growth factors and biological axis CXCL12/CXCR4 axis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Connect Tissue Res.* 2010;51:71–80.
 22. Sfriso P, Cozzi F, Oliviero F, Caso F, Cardarelli S, Facco M, Fitta C, Del Rosso A, Matucci-Cerinic M, Punzi L, Agostini C. CXCL11 in bronchoalveolar lavage fluid and pulmonary function decline in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol.* 2012;30:S71-5.
 23. Walker UA, Tyndall A, Czirják L, Denton C, Farge-Bancel D, Kowal-Bielecka O, Müller-Ladner U, Bocelli-Tyndall C, Matucci-Cerinic M. Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: A report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group database. *Ann Rheum Dis.* 2007;66.
 24. Hunzelmann N, Genth E, Krieg T, Lehmacher W, Melchers I, Meurer M, Moinzadeh P, Müller-Ladner U, Pfeiffer C, Riemekasten G, Schulze-Lohoff E, Sunderkoetter C, Weber M, Worm M, Klaus P, Rubbert A, Steinbrink K, Grundt B, Hein R, et al. The registry of the german network for systemic scleroderma: Frequency of disease subsets and patterns of organ involvement. *Rheumatology.* 2008;47:1185–92.
 25. Bennett RM. Scleroderma overlap syndromes. *Rheum Dis Clin North Am.* 1990;16:185–98.
 26. RODNAN GP, FENNELL RH. Progressive systemic sclerosis sine scleroderma. *JAMA.* 1962;180:665–70.
 27. Mosca M, Neri R, Bombardieri S. Undifferentiated connective tissue diseases (UCTD): A review of the literature and a proposal for preliminary classification criteria. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1999. p. 615–20.
 28. Humrich JY, Riemekasten G. Low-dose IL-2 therapy - a complex scenario that remains to be further explored. *Nat Rev Rheumatol.* 2017;13:386.
 29. Jiang D, Liang J, Hodge J, Lu B, Zhu Z, Yu S, Fan J, Gao Y, Yin Z, Homer R, Gerard C, Noble PW. Regulation of pulmonary fibrosis by chemokine receptor CXCR3. *J Clin Invest.* 2004;114:291–9.
 30. Fujii H, Hasegawa M, Takehara K, Mukaida N, Sato S. Abnormal expression of intracellular cytokines and chemokine receptors in peripheral blood T lymphocytes from patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol.* 2002;130:548–56.
 31. Shimizu S, Yoshinouchi T, Niimi T, Ohtsuki Y, Fujita J, Maeda H, Sato S, Yamadori I, Eimoto T, Ueda R. Differing distributions of CXCR3- and CCR4-positive cells among types of interstitial pneumonia associated with collagen vascular diseases. *Virchows Arch.* 2007;450:51–8.
 32. Cipriani P, Franca Milia A, Liakouli V, Pacini A, Manetti M, Marrelli A, Toscano A,

Pingiotti E, Fulminis A, Guiducci S, Perricone R, Kahaleh B, Matucci-Cerinic M, Ibbamanneschi L, Giacomelli R. Differential expression of stromal cell-derived factor 1 and its receptor CXCR4 in the skin and endothelial cells of systemic sclerosis patients: Pathogenetic implications. *Arthritis Rheum.* 2006;54:3022–33.

33. Schmidt D, Bernat V, Brox R, Tschammer N, Kolb P. Identifying modulators of CXC receptors 3 and 4 with tailored selectivity using multi-target docking. *ACS Chem Biol.* 2015;10:715–24.

34. Andrews SP, Cox RJ. Small Molecule CXCR3 Antagonists. *J. Med. Chem.* 2016. p. 2894–917.

8. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Florian Weigold, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Antibodies against chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 predict progressive deterioration of lung function in patients with systemic sclerosis“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben ist. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

9. Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Weigold F, Günther J, Pfeiffenberger M, Cabral-Marques O, Siegert E, Dragun D, Philippe A, Regensburger AK, Recke A, Yu X, Petersen F, Catar R, Biesen R, Hiepe F, Burmester GR, Heidecke H, Riemekasten G.

Antibodies against chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 predict progressive deterioration of lung function in patients with systemic sclerosis

Arthritis Res Ther. 2018 Mar 22;20(1):52

Es handelt sich um eine ungeteilte Erstautorschaft.

Beitrag des Doktoranden im Einzelnen:

- Konzeption der Studie unter Regie von Frau Prof. Dr. Riemekasten
- Systematische Sammlung, Speicherung und Verarbeitung der Daten
 - Sichtung der Charakterisierungen in Form von ausgefüllten Assessmentbögen
 - Programmierung einer relationalen Datenbank mit graphischer Benutzeroberfläche zur Dateneingabe
 - Manuelle Eingabe der Daten von über 800 Patienten mit über 1900 klinischen Charakterisierungen, über 10.000 laborchemischen Parametern, über 5000 Untersuchungen sowie Nebenerkrankungen und Medikation in die Datenbank
 - Sichtung, Katalogisierung und Auswahl der asservierten Seren
 - Erstellung der Datenbankabfragen
- Analyse der Daten sowie statistische Auswertung
 - Überführung der Datenbankabfragen in die Statistikprogramme
 - Eigenständige und systematische statistische Auswertung
- Interpretation der Ergebnisse in zusammen mit Frau Prof. Dr. Riemekasten
- Konzeption und Verfassung des Manuskripts in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. Riemekasten und Jeannine Günther (Methoden und Ergebnisse Proteinexpression)
- Erstellung der Abbildungen und Tabellen
- Einreichung der Publikation sowie Revision des Manuskripts

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

10. Auszug aus dem ISI Web of Knowledge

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2016** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"RHEUMATOLOGY"** Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 30 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES	39,185	12.811	0.083920
2	Nature Reviews Rheumatology	5,316	12.188	0.020550
3	Arthritis & Rheumatology	5,357	6.918	0.025720
4	RHEUMATOLOGY	17,249	4.818	0.033220
5	OSTEOARTHRITIS AND CARTILAGE	13,462	4.742	0.025770
6	SEMINARS IN ARTHRITIS AND RHEUMATISM	4,700	4.498	0.009620
7	CURRENT OPINION IN RHEUMATOLOGY	4,317	4.475	0.018098
8	ARTHRITIS RESEARCH & THERAPY	13,730	4.121	0.033060
9	BEST PRACTICE & RESEARCH IN CLINICAL RHEUMATOLOGY	3,066	3.581	0.005230
10	RHEUMATIC DISEASE CLINICS OF NORTH AMERICA	1,824	3.341	0.002880
11	JOINT BONE SPINE	3,234	3.329	0.006830
12	ARTHRITIS CARE & RESEARCH	13,414	3.319	0.030120
13	JOURNAL OF RHEUMATOLOGY	22,091	3.150	0.025990
14	Current Rheumatology Reports	2,042	2.865	0.005710
15	SCANDINAVIAN JOURNAL OF RHEUMATOLOGY	2,903	2.667	0.004870
16	CLINICAL AND EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY	7,111	2.634	0.011760
17	International Journal of Rheumatic Diseases	1,416	2.624	0.004470
18	LUPUS	6,259	2.454	0.010270
19	CLINICAL RHEUMATOLOGY	6,347	2.365	0.012420
20	Pediatric Rheumatology	703	2.283	0.002310
21	RHEUMATOLOGY INTERNATIONAL	5,292	1.824	0.012320
22	Modern Rheumatology	2,235	1.818	0.006020
23	BMC MUSCULOSKELETAL DISORDERS	7,100	1.739	0.019470

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
24	JCR-JOURNAL OF CLINICAL RHEUMATOLOGY	1,521	1.322	0.003270
25	Revista Brasileira De Reumatologia	653	1.000	0.001360
26	Acta Reumatologica Portuguesa	326	0.929	0.000680
27	ZEITSCHRIFT FUR RHEUMATOLOGIE	640	0.716	0.000690
28	Archives of Rheumatology	39	0.312	0.000080
28	JOURNAL OF MUSCULOSKELETAL PAIN	268	0.312	0.000260
30	AKTUELLE RHEUMATOLOGIE	44	0.134	0.000030

Copyright © 2017 Thomson Reuters

11. Originalpublikation

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Antibodies against chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 predict progressive deterioration of lung function in patients with systemic sclerosis

Florian Weigold¹, Jeannine Günther^{1,2}, Moritz Pfeiffenberger², Otavio Cabral-Marques³, Elise Siegert¹, Duska Dragun^{4,5}, Aurélie Philippe⁴, Ann-Katrin Regensburger⁶, Andreas Recke⁶, Xinhua Yu⁷, Frank Petersen⁷, Rusan Catar^{4,5}, Robert Biesen¹, Falk Hiepe¹, Gerd R. Burmester¹, Harald Heidecke⁸ and Gabriela Riemekasten^{1,2,3,7*}

Abstract

Background: The chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 are involved in the pathogenesis of fibrosis, a key feature of systemic sclerosis (SSc). It is hypothesized that immunoglobulin (Ig)G antibodies (abs) against these two receptors are present in patients with SSc and are associated with clinical findings.

Methods: Anti-CXCR3 and anti-CXCR4 ab levels were measured in 449 sera from 327 SSc patients and in 234 sera from healthy donors (HD) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In SSc, ab levels were compared with clinical data in a cross-sectional and longitudinal setting. Protein expression of CXCR3 and CXCR4 on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was analyzed in 17 SSc patients and 8 HD by flow cytometry.

Results: Anti-CXCR3 and anti-CXCR4 ab levels were different among SSc subgroups compared with HD and were highest in diffuse SSc patients. The ab levels strongly correlated with each other ($r = 0.85$). Patients with SSc-related interstitial lung disease (SSc-ILD) exhibited higher ab levels which negatively correlated with lung function parameters (e.g., $r = -0.5$ and $r = -0.43$ for predicted vital capacity, respectively). However, patients with deterioration of lung function showed lower anti-CXCR3/4 ab levels compared with those with stable disease. Frequencies and median fluorescence intensities (MFI) of CXCR3⁺ and CXCR4⁺ PBMCs were lower in SSc patients compared with HD and correlated with the severity of skin and lung fibrosis. They correlated with the severity of skin and lung fibrosis.

Conclusions: Anti-CXCR3/4 abs and their corresponding receptors are linked with the severity of SSc-ILD. Antibody levels discriminate patients with stable or decreasing lung function and could be used for risk stratification.

Keywords: Anti-CXCR3, Anti-CXCR4, Systemic sclerosis, Interstitial lung disease, GPCR

Background

Systemic sclerosis (SSc) is a severe autoimmune disease characterized by vasculopathy and fibrosis. In this disease, SSc-related interstitial lung disease (SSc-ILD) is one of the most frequent causes of mortality [1] due to activation

and accumulation of T cells, neutrophils, and monocytes in the inflammation sites. C-X-C motif chemokine receptor (CXCR)3 and CXCR4 are G protein-copled receptors (GPCRs) mediating the migration of different cells including lymphocytes, endothelial progenitor cells, and stem cells [2, 3]. CXCR3, which can bind to several proinflammatory chemokines, is induced on naive T cells upon activation by interferon gamma-inducible ligands present in inflamed tissues. As a result, CXCR3⁺ T cells, predominantly Th1 cells, are recruited to sites of inflammation [4]. CXCR3 is also expressed on plasmacytoid dendritic and

* Correspondence: gabriela.riemekasten@uksh.de

¹Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Charité University Hospital, Berlin, Germany

²Cell Autoimmunity Group, German Rheumatism Research Center (DRFZ), Berlin, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



natural killer (NK) cells [4, 5]. An increased number of CXCR3⁺ cells were also found in lupus nephritis and in atherosclerotic lesions secondary to systemic lupus erythematosus (SLE) [6, 7]. CXCR4 is a specific receptor for stromal-derived factor 1 (SDF-1, also called C-X-C motif chemokine ligand 12 or CXCL12), a molecule with potent chemotactic activity for lymphocytes and neutrophils [5]. Involvement of the CXCR4/SDF-1 axis is discussed in several diseases including inflammatory bowel diseases, ischemia/reperfusion injury, and in idiopathic pulmonary fibrosis. CXCR4⁺ cells as well as their ligands CXCL11 and CXCL12 have been shown to be associated with the pathogenesis of pulmonary complications in patients with autoimmune diseases [8–11]. Furthermore, CXCL11 levels in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) from SSc patients predicted progressive SSc-ILD [12].

As recently reported by our group, immunoglobulin (Ig)G from SSc patients is able to induce ILD and vasculopathy in C57BL/6 mice indicating a pathogenic role of antibodies. IgG from SSc patients directly enhances *in vitro* migration of T cells and neutrophils correlating with anti-angiotensin II type I receptor (AT1R)/endothelin receptor type A (ETAR) antibody (ab) levels [13, 14]. In addition, anti-AT1R and anti-ETAR abs induced the production of different cytokines, Ca²⁺, and chemokines by various cells, which were inhibited by AT1R or ETAR blockers [13–18]. However, the inhibition was partially incomplete or even absent indicating antibody-mediated activation of other receptors. In SSc patients, anti-AT1R and anti-ETAR ab levels were predictive for vascular complications such as pulmonary arterial hypertension (PAH) or digital ulcers [15–17, 19], but they were not able to predict deterioration of pulmonary fibrosis. Assuming the existence of antibodies against CXCR3 and CXCR4, our group has developed enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) to measure their concentrations in sera. Here, we asked whether anti-CXCR3 and anti-CXCR4 antibodies or the receptors could be used as biomarkers for SSc or for SSc-related organ damage.

Methods

We analyzed 449 sera from 327 consecutive SSc patients from the Charité University Hospital for anti-CXCR3 abs; 425 sera from 312 SSc patients were analyzed for the presence of anti-CXCR4 abs. Epidemiologic data of the 327 SSc patients are shown in Additional file 1: Table S1 and baseline lung function parameters at the time point of anti-CXCR3/4 ab detection are given in Additional file 1: Table S2. The mean time between disease onset and determination of ab values is 8.5 ± 6.9 years for anti-CXCR3 and 8.4 ± 6.9 years for anti-CXCR4.

In comparison, sera from 234 healthy donors (HD) (68.4% male and 31.6% female, with a mean age of 36.6 ± 12.8 years) were analyzed.

SSc patients were divided into different disease subsets according to the criteria of the EUSTAR and DNSS network [20–25]. Comorbidities were assessed in routine clinical practice as documented in the medical charts. Only those comorbidities that were present in at least 10 patients were analyzed. If multiple ab samples/clinical assessments were registered per patient, only the latest sample was considered in cross-sectional analyses. SSc patients with a follow-up period of at least 3 years were analyzed to identify the predictive capacity of the ab.

SSc-ILD was defined according to the guidelines from the German Network of Systemic Sclerosis and the definition has been applied and used for several studies. Accordingly, diagnosis of SSc-ILD was established when bilateral basal fibrosis occurred, confirmed by chest x-ray and/or high-resolution computed tomography (HR-CT) scan together with restrictive pulmonary abnormalities on pulmonary function tests (forced vital capacity (FVC) < 80%). Regularly, in patients with limited cutaneous disease and particularly in those with anti-Centromer ab and normal lung function, an HR-CT scan is not required and the x-ray is sufficient for primary diagnosis. Lung fibrosis was only quantified indirectly by lung function tests; quantitative analyses of HR-CT scans were not performed in our clinical routine setting.

Here, in our cross-sectional analyses for anti-CXCR3 ab, 35% of the patients have a diagnosed SSc-ILD, 23% of them with FVC < 70%. In analyses for anti-CXCR4 ab, 33% of the patients have a diagnosed SSc-ILD, 31% of them with FVC < 70%.

Detection of anti-CXCR3 and anti-CXCR4 IgG by solid-phase assay

Anti-CXCR3 and anti-CXCR4 IgG ab were measured by a commercially available sandwich ELISA (CellTrend GmbH Luckenwalde, Germany). Briefly, duplicate samples of a 1:100 serum dilution were incubated at 4 °C for 2 h. All sera were analyzed by personnel blinded to the clinical characteristics of the patients.

Isolation of peripheral blood mononuclear cells and flow cytometry

CXCR3 and CXCR4 protein expression was measured on peripheral blood mononuclear cell (PBMC) subpopulations from 17 SSc patients (eight diffuse cutaneous (d)SSc patients, 8 SSc patients with limited cutaneous (l)SSc, and one patient with overlap syndrome) and eight HD by flow cytometry. Epidemiologic data of the patients are given in Additional file 1: Table S1. PBMCs were isolated using Ficoll-Paque gradient centrifugation as described previously [18], identified by their corresponding CD surface antigens (CD4, T helper cells; CD8, cytotoxic T cells; CD19, B cells; CD14, monocytes), stained *ex vivo* or immediately after isolation, and fixed

with 4% paraformaldehyde. Cytometric assays were performed using an LSR II flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software (TreeStar, Ashland, OR, USA). Frequencies were normalized to the corresponding isotype control, calculating the difference between isotype control (between 0 and 5%) and receptor-stained cells within the identical gate. For median of fluorescence intensity (MFI), the ratio of the MFI of receptor-stained cells and the MFI of isotype control was calculated. The other ab, as well as methods describing T-cell isolation and chemotaxis assays, are given in Additional file 1: Supplemental Material and Methods.

Statistical analysis

Associations between categorical data were measured using Chi squared or Fisher's exact test. Nonparametric Kruskal-Wallis test with Dunn-Bonferroni post-hoc tests, Mann-Whitney *U* test and Spearman's rho were used to examine noncategorical, non-normal distributed values. Receiver operating characteristic (ROC) analyses were performed to identify the best cut-off points for ab levels for patients with and without deterioration of lung function. Log-rank test and Cox proportional hazards model were performed to identify the predictive value of anti-CXCR3 and anti-CXCR4 ab regarding deterioration of lung function parameters (estimation of hazard ratios and baseline adjustment of lung function parameters, age, and sex).

For receptor expression, statistics were performed using Prism5 software (GraphPad Inc., La Jolla, USA). A value of $p \leq 0.05$ was interpreted as statistically significant.

Results

Anti-CXCR3 and anti-CXCR4 antibody levels show strong correlations with each other and are different among the different disease subsets

Anti-CXCR3 and anti-CXCR4 ab levels in sera from SSc patients were compared with those from HD (Additional file 1: Figure S1a, b). Median values of anti-CXCR3 abs were 3.5 Units (U) (95% confidence interval (CI) 2.9–3.8) in HD and

3.8 U in SSc patients (95% CI 3.2–4.2), showing no significant differences ($p = 0.12$). On the other hand, median values of anti-CXCR4 abs were higher in SSc patients (3.3 U, 95% CI 3–3.8) compared with HD (2.7 U, 95% CI 2.5–3; $p \leq 0.001$). However, 12.2% and 17.2% of the SSc patients displayed anti-CXCR3 and anti-CXCR4 ab levels above the 95th percentile in comparison to HD, respectively. The levels of anti-CXCR3 and anti-CXCR4 abs strongly correlate with each other in HD and in SSc patients ($r = 0.89$ and $r = 0.85$, respectively; $p \leq 0.001$, $n = 198$ and $n = 312$; Fig. 1). In SSc patients, anti-CXCR3 and anti-CXCR4 ab levels were weakly and negatively correlated with the corresponding ages at assessment ($r = -0.2$, $p \leq 0.001$; and $r = -0.2$, $p \leq 0.001$, respectively) and with the age at SSc diagnosis ($r = -0.24$, $p \leq 0.001$; and $r = -0.27$, $p \leq 0.001$, respectively), but not with disease duration (data not shown). In contrast, HD show positive correlations for both anti-CXCR3 and anti-CXCR4 ab levels with age ($r = 0.13$, $p \leq 0.05$; and $r = 0.16$, $p \leq 0.05$, respectively).

Anti-CXCR3 ab levels were higher in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis (dSSc) compared with patients with limited cutaneous systemic sclerosis (lSSc) ($p \leq 0.001$) and HD ($p \leq 0.001$; Fig. 2); 17.6% of the dSSc patients revealed anti-CXCR3 ab levels above the 95th percentile. Similarly, anti-CXCR4 ab levels were higher in dSSc patients compared with those in lSSc patients ($p \leq 0.05$) and HD ($p \leq 0.001$). In line with this, anti-topoisomerase I ab-positive patients have slightly higher anti-CXCR3 levels than anti-topoisomerase I ab-negative patients (median 4.1 vs. 4.7 U; $p \leq 0.05$, $n = 252$). No significant differences were observed for anti-CXCR4 abs. Patients with overlap syndromes revealed markedly increased ab levels compared with HD ($p = 0.056$); 25.5% of the dSSc patients have anti-CXCR4 ab levels above the 95th percentile of the HD.

Anti-CXCR3 and anti-CXCR4 antibodies are markers for lung involvement

The cross-sectional analyses showed that the subgroup of patients with confirmed SSc-ILD and FVC < 70% had

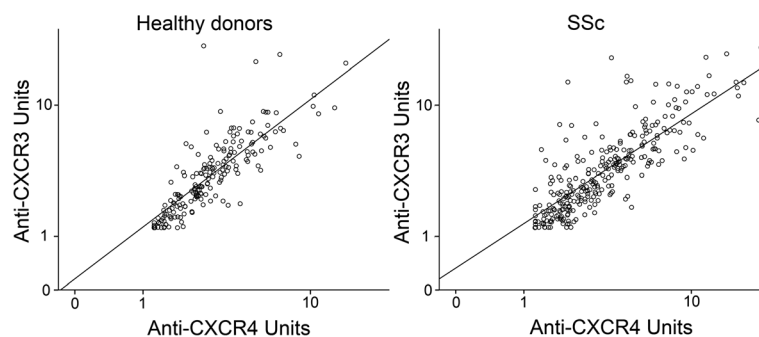
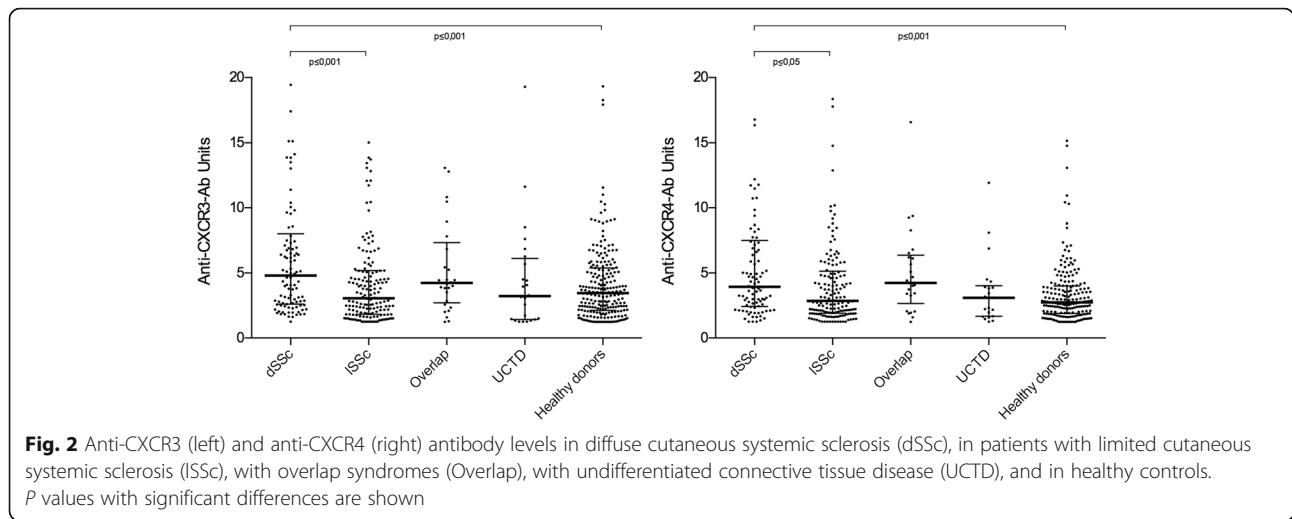


Fig. 1 Anti-CXCR3 and anti-CXCR4 antibody levels were strongly correlated in healthy donors (left) as well as in systemic sclerosis (SSc) patients (right)



significantly lower median anti-CXCR3 and anti-CXCR4 ab levels than those with FVC $\geq 70\%$ (2.9 U vs. 4.8 U, $p \leq 0.01$, $n = 82$; and 2.8 U vs. 5.0 U, $p \leq 0.05$, $n = 78$, respectively). In the next step, we studied correlations between ab levels and different metric clinical parameters of SSc patients. Significant negative correlations exist between anti-CXCR3 ab levels and the predicted percentages of vital capacity (VC), FVC, total lung capacity (TLC) and the diffusing capacity for carbon monoxide measured by a single breath (DLCO-SB). Anti-CXCR4 abs revealed similar correlations with lung function parameters (Table 1), indicating that high anti-CXCR3 and anti-CXCR4 ab levels are associated with more severely impaired lung function. In line with this, higher median anti-CXCR3 and anti-CXCR4 ab levels were present in patients with SSc-ILD compared with those without ILD (3.4 U vs. 4.1 U, $p \leq 0.05$; and 3.1 U vs. 3.9 U, $p \leq 0.05$, respectively).

Table 1 Correlations between anti-CXCR3 and anti-CXCR4 antibody levels and lung function parameters in systemic sclerosis patients

Lung function parameter	Anti-CXCR3			Anti-CXCR4		
	SRT-r	p values	n	SRT-r	p values	n
VC (%)	-0.50	≤ 0.001	71	-0.43	≤ 0.001	58
FVC (%)	-0.27	≤ 0.001	284	-0.2	≤ 0.001	271
TLC (%)	-0.25	≤ 0.001	253	-0.21	≤ 0.001	240
DLCO-SB (%)	-0.32	≤ 0.01	274	-0.26	≤ 0.05	64
DLCO/VA (%)	-0.20	$= 0.08$	245	-0.16	$= 0.20$	64
FEV1 (%)	-0.18	≤ 0.01	278	-0.17	≤ 0.01	265
FEV1/VC (%)	+0.25	≤ 0.05	71	+0.2	$= 0.13$	58

R values of Spearman's rho (SRT-r) as well as p values are shown
 Vital capacity (VC), forced vital capacity (FVC), total lung capacity (TLC), the diffusing capacity for carbon monoxide (DLCO) measured by a single breath (DLCO-SB), DLCO/VA, forced expiratory volume in 1 s (FEV1), and Tiffeneau index (FEV1/VC) are given

No correlations were present between anti-CXCR3 and anti-CXCR4 ab levels and modified Rodnan Skin Score (mRSS), mean pulmonary arterial pressure (mPAP), systolic pulmonary arterial pressure (sPAP), or left ventricular ejection fraction (LVEF) (data not shown). For anti-CXCR3 ab levels, weak correlations existed with erythrocyte sedimentation rate (ESR) levels ($r = 0.16$, $p \leq 0.05$, $n = 251$), but not with C-reactive protein (CRP) values (data not shown).

Anti-CXCR3 and anti-CXCR4 antibodies were also associated with other clinical symptoms as shown in Additional file 1: Tables S3 and S4.

High anti-CXCR3/4 antibody levels correspond to and predict stable lung function

SSc patients with 3-year follow-up investigations were analyzed to identify the role of anti-CXCR3/4 abs to predict progression in SSc-ILD. SSc patients were grouped into those having $> 10\%$ deterioration in DLCO-SB, DLCO/VA, FVC, forced expiratory volume in 1 s (FEV1), and TLC values, and those with stable lung function parameters. Ab samples were obtained at the beginning of the 3-year follow-up. ROC analyses (Youden's-Index) were performed for all lung function parameters to identify the best cut-off values which can discriminate between stable and progressive diseases within 3 years. For clinical practicality, the median value (6.2 U for anti-CXCR3 and 5.18 U for anti-CXCR4) is used for all parameters.

In general, patients with lower levels of anti-CXCR3/CXCR4 abs have progressively impaired lung function during this follow-up period (Table 2).

Cumulative percentages of patients with deterioration $> 10\%$ of predicted FVC and FEV1 levels are shown in Fig. 3.

Within 12 months, 44% of the patients with anti-CXCR3 ab levels < 6.2 U showed a reduction in FVC values $\geq 10\%$, but this was only true for 13% of the patients with high ab levels. Similar results were

Table 2 Higher anti-CXCR3 and anti-CXCR4 antibody levels are associated with stable lung function parameters

Parameter	Patients above cut-off (%)		Patients below cut-off (%)		<i>p</i> values	Number of analyzed patients	Hazard ratios
	Deterioration \geq 10%	No deterioration	Deterioration \geq 10%	No deterioration			
Anti-CXCR3 antibodies							
FVC (%)	25.0	75.0	59.3	40.7	\leq 0.01	59	0.32
FEV1 (%)	23.5	76.5	71.1	28.9	\leq 0.001	72	0.22
DLCO-SB (%)	36.4	63.6	63.6	36.4	\leq 0.05	55	0.47
DLCO/VA (%)	42.4	57.6	70.4	29.6	\leq 0.05	60	0.38
Anti-CXCR4 antibodies							
FVC (%)	22.2	77.8	70.0	30.0	\leq 0.001	47	0.2
FEV1 (%)	33.3	66.7	78.6	21.4	\leq 0.001	61	0.27
TLC (%)	33.3	66.7	64.7	35.3	\leq 0.05	44	0.33
DLCO-SB (%)	43.3	56.7	75.0	25.0	\leq 0.05	46	0.46
DLCO/VA (%)	39.4	60.6	82.4	17.6	\leq 0.001	50	0.24

Patients with antibody levels above and below cut-off, with and without deterioration in forced vital capacity (FVC), forced expiratory volume in 1 s (FEV1), total lung capacity (TLC), the diffusing capacity for carbon monoxide (DLCO) measured by a single breath (DLCO-SB), and DLCO/VA within 3 years, *p* values (log-rank test) as well as number of analyzed patients are shown

Hazard ratios derived from the Cox proportional hazards model highlight the relationship between deterioration in lung function parameters and anti-CXCR3/anti-CXCR4 antibody levels

obtained at month 24 (56% versus 19%) and at month 36 (59% versus 25%). Baseline adjustment for lung function parameters, age, and sex did not reveal significant differences in the FVC deterioration. Anti-CXCR4 ab levels appear to discriminate better between patients with and without FVC deterioration. At month 12, 55% of the SSc patients with anti-CXCR4 ab levels $<$ 5.18 U revealed deterioration in FVC values, but this was the case in only 11% of the patients with higher ab levels. Similar results were obtained at months 24 (70% versus 15%) and at months 36 (70% versus 22%). Low anti-CXCR3 and anti-CXCR4 ab levels were also predictive for deterioration in TLC, DLCO-SB, and DLCO/VA values.

CXCR3 and CXCR4 protein expressions are related to signs of fibrosis

The protein expressions of CXCR3 and CXCR4 were analyzed in PBMCs of SSc patients as well as HD. The percentages of peripheral blood monocytes, CD8⁺ T cells, and B cells expressing CXCR3 as well as CXCR4 were lower in SSc patients compared with HD (Additional file 1: Figure S2 shows the percentages of cells expressing CXCR3). In addition, MFIs were reduced for CXCR3 and CXCR4 in monocytes, CD8⁺ T cells, and B cells of SSc patients compared with those found in HD (Additional file 1: Figure S2).

In CD14⁺ monocytes, both the percentage of CXCR3-expressing cells as well as their MFI inversely correlated with the FVC values (Fig. 4a, b). The MFI of CXCR4-positive CD4⁺ T cells correlated well with the mRSS (Fig. 4c). The MFI of CXCR4 expression on monocytes correlated with the years since onset of Raynaud's

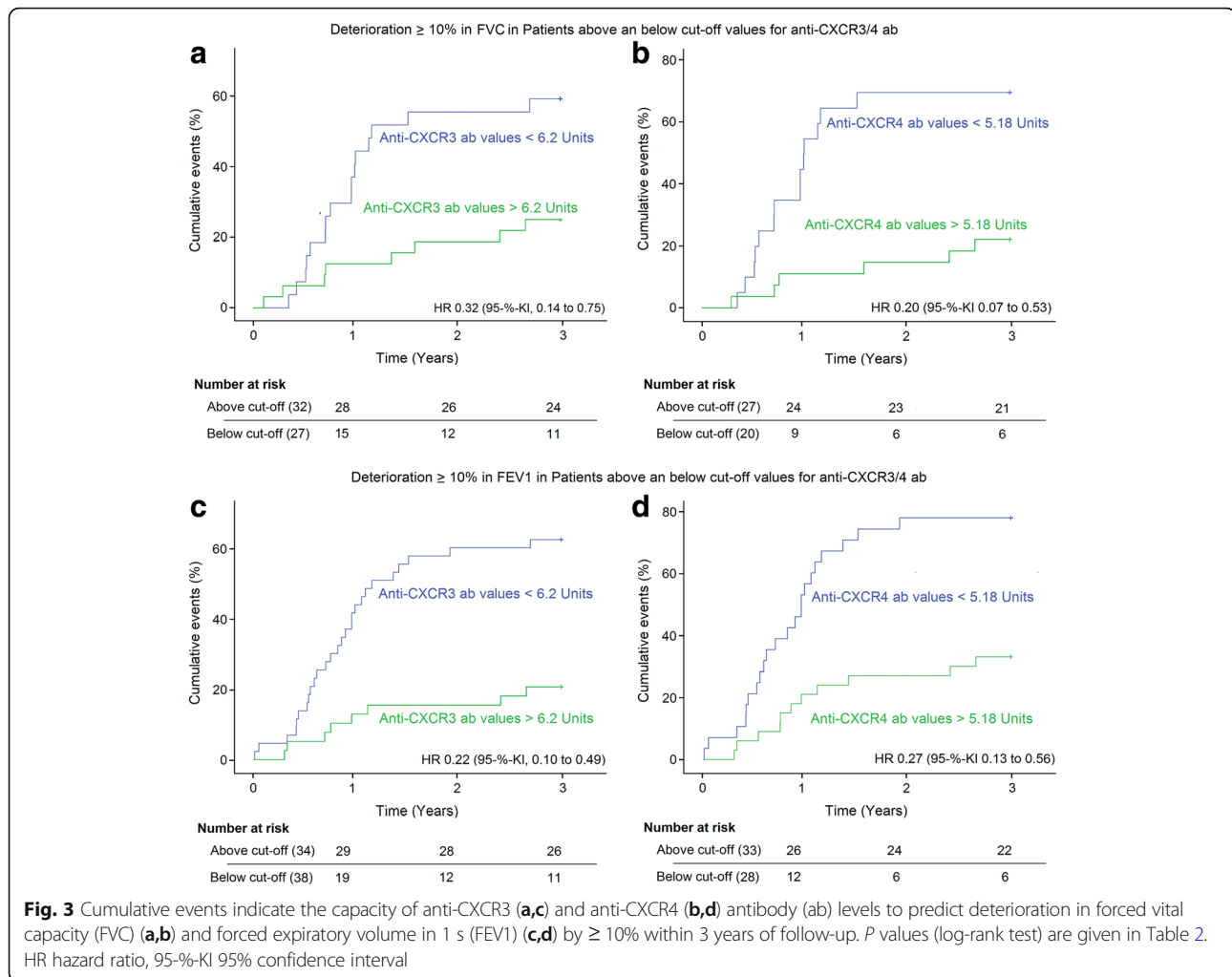
phenomenon ($r = 0.53$, $p \leq 0.05$), with years since the start of fibrosis ($r = 0.52$, $p \leq 0.05$), and with years since the first organ involvement ($r = 0.54$, $p \leq 0.05$) (Fig. 4f).

Discussion

In the present study, autoantibodies against the chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 were mainly linked to the presence of SSc-ILD. Patients with dSSc and those with lung fibrosis revealed higher anti-CXCR3 and anti-CXCR4 ab levels compared with those with lSSc and without SSc-ILD. The ab levels weakly and negatively correlated with lung function parameters. In addition, CXCR3 and CXCR4 receptor expression in PBMCs correlated with the extent of lung and skin fibrosis. However, the deterioration of lung function parameters was associated with low anti-CXCR3 and anti-CXCR4 ab levels. In addition, low anti-CXCR3 and anti-CXCR4 ab levels predicted progressive impairment of lung function parameters.

The involvement of CXCR3 and CXCR4 has already been discussed in the pathogenesis of systemic sclerosis. Cipriani et al. have shown an upregulation of CXCR4 and SDF-1 in the skin of early systemic sclerosis patients [26, 27]. However, increased, normal, and decreased percentages of CXCR3⁺ cells have been described in SSc [28–30]. Here, percentages of CXCR3 and CXCR4⁺ cytotoxic T cells, B cells, and monocytes were lower in SSc patients compared with HD. This could reflect reduced activation of cells, downregulation of receptor expression by chronic stimulation, or migration of these cells from the blood stream into the tissue; this remains to be studied.

Here, anti-CXCR3 and anti-CXCR4 ab levels are shown to be very good markers of predicting lung fibrosis and are, therefore, candidates to stratify patients for



disease progression, e.g., in clinical studies. This is the main finding of our study. The association of high ab levels with signs of lung fibrosis and reduced progression of lung fibrosis seems to be a contradiction at first glance. A similar observation was found for regulatory T cells (Treg), which strongly correlate with disease activity in lupus [31]. This could be suggestive for their pathogenic role. Nevertheless, enrichment of Treg improved lupus activity illustrating that high Treg numbers do not necessarily indicate a pathogenic role of the Treg [31]. Similar to the beneficial role of Treg, the prediction of progressive deterioration of FVC values by low anti-CXCR3/4 levels suggests a protective effect of the antibodies, which needs to be further evaluated.

In our previous studies, anti-CXCR3/4 levels and anti-AT1R/ETAR ab levels were not able to predict progressive SSc-ILD (data not shown). Anti-CXCR3 and anti-CXCR4 ab levels correlate moderately with those of the anti-AT1R and anti-ETAR ab ($r = 0.39$ to $r = 0.43$, data not shown). Functionally, anti-AT1R/ETAR abs are stimulatory and agonistic to their natural ligands [32].

The previously described correlation between cell migration and the levels of anti-AT1R and anti-ETAR abs indicate a dominant role of anti-AT1R/ETAR abs in cell migration in SSc [14, 15]. As shown in the supplementary results (Additional file 1: Figure S3), IgG fractions from patients with high anti-CXCR3/4 abs also mediate migration via CXCR3 and probably via CXCR4 as suggested by blocking experiments with specific receptor blockers. Migration of lymphocytes was not dependent on the anti-CXCR3/4 ab levels (data not shown). Sequence identity between CXCR3 and CXCR4 abs and between anti-CXCR4 and anti-AT1R abs has been described [33, 34]. According to this, anti-CXCR3/4 ab levels as well as relative high receptor expressions could interfere with the effects of anti-AT1R/ETAR abs on cell migration. However, alterations in the anti-CXCR3/4 ab levels as well as in CXCR3 and CXCR4 expression were linked with fibrosis, suggesting a disturbed CXCR3/4 system in this condition.

Our study has some limitations. The assessment was performed in a routine clinical setting leading to some

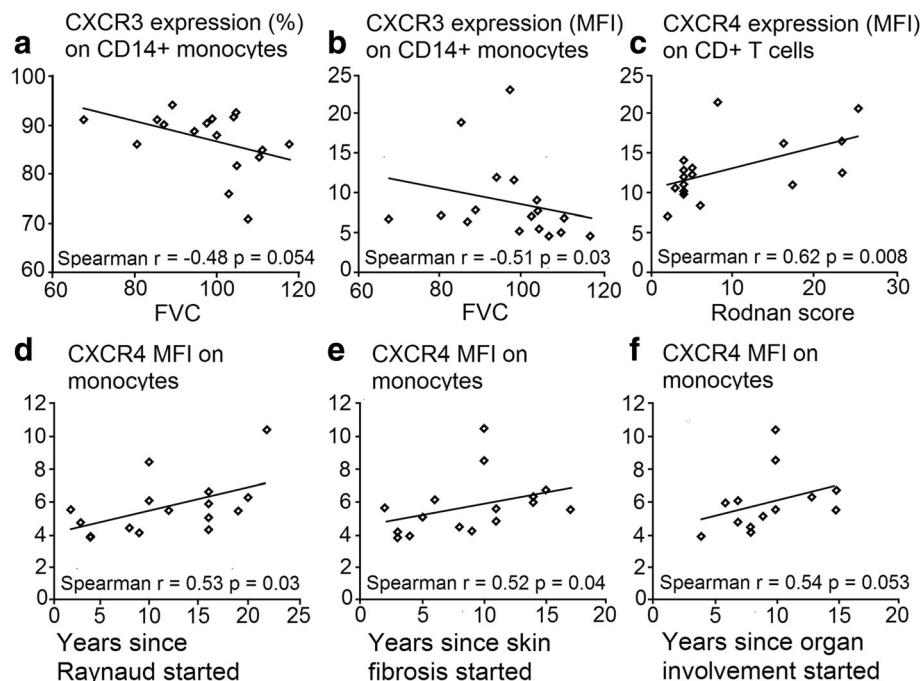


Fig. 4 Frequency of CXCR3-positive CD14⁺ monocytes among CD14⁺ monocytes (a) as well as CXCR3 density (b) on CD14⁺ monocytes show a negative correlation with the predicted percentages of forced vital capacity (FVC). (c) CXCR4 density on CD4⁺ T cells related to isotype controls correlated with modified Rodnan Skin Score (mRSS). Correlation between CXCR4 expressions on monocytes (MFIs) with years since diagnosis (d), start of fibrosis (e), and since first organ involvement (f, first non-Raynaud symptom). Statistical analyses were performed by Spearman's correlation; * $p \leq 0.05$. MFI median fluorescence intensity

missing clinical parameters. Based on the earlier availability of the CXCR3 ELISA, anti-CXCR4 abs were not measured in all patients. However, in the vast majority, anti-CXCR3 and anti-CXCR4 abs were measured in parallel in one individual. Also, we did not study patients with other diseases. This is a limitation that should be addressed in the future as well as analyzing cross-reactions of the antibodies. In addition, we used lung function parameters as surrogate markers for lung fibrosis and did not measure lung fibrosis by quantitative CT scans. In this study, we did not investigate the predictive value of these antibodies on mortality, nor did we investigate the effects of disease-modifying agents on the results. Finally, specific functions of the abs remain to be studied.

Conclusions

In conclusion, we have identified novel anti-GPCR abs against the chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 in patients with systemic sclerosis linking autoimmunity with interstitial lung disease. Antibody levels discriminate patients with stable or decreasing lung function and could be used for risk stratification. We suggest a functional role of anti-CXCR3/4 abs and highlight their potential contribution to the orchestra of other antibodies.

Additional file

Additional file 1: Supplementary material. (ZIP 236 kb)

Abbreviations

ab: Antibody; AT1R: Anti-angiotensin II type I receptor; BALF: Bronchoalveolar lavage fluid; CI: Confidence interval; CRP: C-reactive protein; CXCR: C-X-C motif chemokine receptor; DLCO-SB: Diffusing capacity for carbon monoxide by a single breath; dSSc: Diffuse cutaneous systemic sclerosis; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; ESR: Erythrocyte sedimentation rate; ETAR: Endothelin receptor type A; FEV1: Forced expiratory volume in one second; FVC: Forced vital capacity; GPCR: G protein-coupled receptor; HD: Healthy donors; HR-CT: High-resolution computed tomography; Ig: Immunoglobulin; ILD: Interstitial lung disease; lSSc: Limited cutaneous systemic sclerosis; LVEF: Left ventricular ejection fraction; MFI: Median fluorescence intensity; mPAP: Mean pulmonary arterial pressure; mRSS: Modified Rodnan Skin Score; PAH: Pulmonary arterial hypertension; PBMC: Peripheral blood mononuclear cell; ROC: Receiver operating characteristic; SDF-1: Stromal-derived factor 1; SLE: Systemic lupus erythematosus; sPAP: Systolic pulmonary arterial pressure; SSs: Systemic sclerosis; TLC: Total lung capacity; Treg: Regulatory T cells; VC: Vital capacity

Acknowledgments

The authors thank all the patients and healthy controls for their participation in this study.

Funding

We thank the Mirjam Lichy foundation for support as well as the DFG grant RI 1056-11-1/2 for financial support. We also thank Actelion Pharmaceutical GmbH, the Eppenauer/Gutzeit foundation, the German network of Systemic Sclerosis, as well as the EUSTAR network for their support. The study was promoted by the Charité University Hospital in Berlin and University Hospital of Schleswig-Holstein Campus Lübeck.

Availability of data and materials

The datasets acquired and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

FW, JG, and GR designed the study, analyzed and interpreted the data, and wrote the manuscript. JG, MP, and AP performed the experiments. MP, OCM, ES, DD, AP, AKR, AR, XY, FP, RC, RB, FH, GRB, and HH made substantial contributions to data analysis, design, data interpretation, data acquisition, data assessment, statistics, and drafting of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Ethical approval and signed consent of the patients were obtained (EA1/042/09, EA1/013/05, EA1/160/10; Ethics committee, Charité University Hospital, Berlin, Germany).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

GR is an advisor for CellTrend. HH is manager of CellTrend. The remaining authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Charité University Hospital, Berlin, Germany. ²Cell Autoimmunity Group, German Rheumatism Research Center (DRFZ), Berlin, Germany. ³Department of Rheumatology, University of Lübeck, Lübeck, Germany. ⁴Department of Nephrology and Critical Care Medicine, Charité University Hospital, Campus Virchow, Berlin, Germany. ⁵Berlin Institute of Health, Berlin, Germany. ⁶Department of Dermatology, University of Lübeck, Lübeck, Germany. ⁷Research Center Borstel, Airway Research Center North (ARCN), Members of the German Center for Lung Research (DZL), Borstel, Germany. ⁸CellTrend GmbH, Luckenwalde, Brandenburg, Germany.

Received: 11 September 2017 Accepted: 18 February 2018

Published online: 22 March 2018

References

- Tyndall AJ, Bannert B, Vonk M, Airo P, Cozzi F, Carreira PE, et al. Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. *Ann Rheum Dis*. 2010;69:1809–15.
- Groom JR, Luster AD. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol Cell Biol*. 2011;89:207–15.
- Murdoch C. CXCR4: chemokine receptor extraordinaire. *Immunol Rev*. 2000;177:175–84.
- Lacotte S, Brun S, Muller S, Dumortier H. CXCR3, inflammation, and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1173:310–7.
- Hummel S, Van Aken H, Zarbock A. Inhibitors of CXC chemokine receptor type 4: putative therapeutic approaches in inflammatory diseases. *Curr Opin Hematol*. 2014;21:29–36.
- Enghard P, Humrich JY, Rudolph B, Rosenberger S, Biesen R, Kuhn A, et al. CXCR3+CD4+ T cells are enriched in inflamed kidneys and urine and provide a new biomarker for acute nephritis flares in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum*. 2009;60:199–206.
- Clement M, Charles N, Escoubet B, Guedj K, Chauveheid MP, Caligiuri G, et al. CD4+CXCR3+ T cells and plasmacytoid dendritic cells drive accelerated atherosclerosis associated with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun*. 2015;63:59–67.
- Tourkina E, Bonner M, Oates J, Hofbauer A, Richard M, Znoyko S, et al. Altered monocyte and fibrocyte phenotype and function in scleroderma interstitial lung disease: reversal by caveolin-1 scaffolding domain peptide. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2011;4:15.
- Andersson-Sjoland A, de Alba CG, Nihlberg K, Becerril C, Ramirez R, Pardo A, et al. Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40:2129–40.
- Costello CM, McCullagh B, Howell K, Sands M, Belperio JA, Keane MP, et al. A role for the CXCL12 receptor, CXCR7, in the pathogenesis of human pulmonary vascular disease. *Eur Respir J*. 2012;39:1415–24.
- Antoniou KM, Soufla G, Lymbouridou R, Economidou F, Lasithiotaki I, Manousakis M, et al. Expression analysis of angiogenic growth factors and biological axis CXCL12/CXCR4 axis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Connect Tissue Res*. 2010;51:71–80.
- Sfriso P, Cozzi F, Oliviero F, Caso F, Cardarelli S, Facco M, et al. CXCL11 in bronchoalveolar lavage fluid and pulmonary function decline in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol*. 2012;30:S71–5.
- Günther J, Kill A, Becker MO, Heidecke H, Rademacher J, Siegert E, 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*. 2014;16:R65.
- Kill A, Tabeling C, Undeutsch R, Kühl AA, Günther J, Radic M, et al. Autoantibodies to angiotensin and endothelin receptors in systemic sclerosis induce cellular and systemic events associated with disease pathogenesis. *Arthritis Res Ther*. 2014;16:R29.
- Becker MO, Kill A, Kutsche M, Guenther J, Rose A, Tabeling C, et al. Vascular receptor autoantibodies in pulmonary arterial hypertension associated with systemic sclerosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;190:808–17.
- Günther J, Rademacher J, van Laar JM, Siegert E, Riemekasten G. Functional autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin Immunopathol*. 2015;37:529–42.
- Riemekasten G, Philippe A, Näther M, Slowinski T, Müller DN, Heidecke H, et al. Involvement of functional autoantibodies against vascular receptors in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2011;70:530–6.
- Rademacher J, Kill A, Mattat K, Dragun D, Siegert E, Günther J, et al. Monocytic angiotensin and endothelin receptor imbalance modulate secretion of the profibrotic chemokine ligand 18. *J Rheumatol*. 2016;43:587–91.
- Avouac J, Riemekasten G, Meune C, Ruiz B, Kahan A, Allanore Y. Autoantibodies against endothelin 1 type A receptor are strong predictors of digital ulcers in systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2015;42:1801–7.
- Walker UA, Tyndall A, Czirjak L, Denton C, Farge-Bancel D, Kowal-Bielecka O, et al. Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group. *Ann Rheum Dis*. 2007;66(6):754–63.
- Hunzelmann N, Genth E, Krieg T, Lehman W, Melchers I, Meurer M, et al. The registry of the German network for systemic scleroderma: frequency of disease subsets and patterns of organ involvement. *Rheumatology*. 2008;47:1185–92.
- Carwile LeRoy E, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol*. 1988;15:202–5.
- Bennett RM. Scleroderma overlap syndromes. *Rheum Dis Clin N Am*. 1990;16:185–98.
- Rodnan GP, Fennell RH. Progressive systemic sclerosis sine scleroderma. *JAMA*. 1962;180:665–70.
- Mosca M, Neri R, Bombardieri S. Undifferentiated connective tissue diseases (UCTD): a review of the literature and a proposal for preliminary classification criteria. *Clin Exp Rheumatol*. 1999;17:615–20.
- Cipriani P, Franca Milia A, Liakouli V, Pacini A, Manetti M, Marrelli A, et al. Differential expression of stromal cell-derived factor 1 and its receptor CXCR4 in the skin and endothelial cells of systemic sclerosis patients: pathogenetic implications. *Arthritis Rheum*. 2006;54:3022–33.
- Makino H, Aono Y, Azuma M, Kishi M, Yokota Y, Kinoshita K, et al. Antifibrotic effects of CXCR4 antagonist in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J Med Invest*. 2013;60:127–37.
- Jiang D, Liang J, Hodge J, Lu B, Zhu Z, Yu S, et al. Regulation of pulmonary fibrosis by chemokine receptor CXCR3. *J Clin Invest*. 2004;114:291–9.
- Fujii H, Hasegawa M, Takehara K, Mukaida N, Sato S. Abnormal expression of intracellular cytokines and chemokine receptors in peripheral blood T lymphocytes from patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol*. 2002;130:548–56.
- Shimizu S, Yoshinouchi T, Niimi T, Ohtsuki Y, Fujita J, Maeda H, et al. Differing distributions of CXCR3- and CCR4-positive cells among types of

interstitial pneumonia associated with collagen vascular diseases. *Virchows Arch.* 2007;450:51–8.

31. Humrich JY, Riemekasten G. Low-dose IL-2 therapy—a complex scenario that remains to be further explored. *Nat Rev Rheumatol.* 2017;13:386.
32. Cabral-Marques O, Riemekasten G. Vascular hypothesis revisited: role of stimulating antibodies against angiotensin and endothelin receptors in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2016;15:690–4.
33. Schmidt D, Bernat V, Brox R, Tschammer N, Kolb P. Identifying modulators of CXC receptors 3 and 4 with tailored selectivity using multi-target docking. *ACS Chem Biol.* 2015;10:715–24.
34. Andrews SP, Cox RJ. Small Molecule CXCR3 Antagonists. *J Med Chem.* 2016; 59:2894–917.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



12. Supplement

Supplementary Material and Methods

Antibodies used for flow cytometry

Mouse IgG anti-human CD3 cyanin 5 (clone UCHT-1) and mouse IgG anti-human CD14 Alexa 700 (clone TM1) were obtained from the German Rheumatism Research Center (DRFZ, Berlin, Germany). Mouse IgG anti-human CD4 allophycocyanin-cyanin 7 (clone RPA-T4, cat. No. 300518), mouse IgG anti-human CD183 (CXCR3) Alexa 488 (clone G025H7, cat. no. 353710) and the respective isotype control mouse IgG1 Alexa 488 (clone MOPC-21, cat. no. 400129), mouse IgG anti-human CD184 (CXCR4) phycoerythrin (clone 12G5, cat. no. 306506) and the respective isotype control mouse IgG2a phycoerythrin (MOPC-173, cat. no. 400212) were obtained from Biolegend (San Diego, CA, USA).

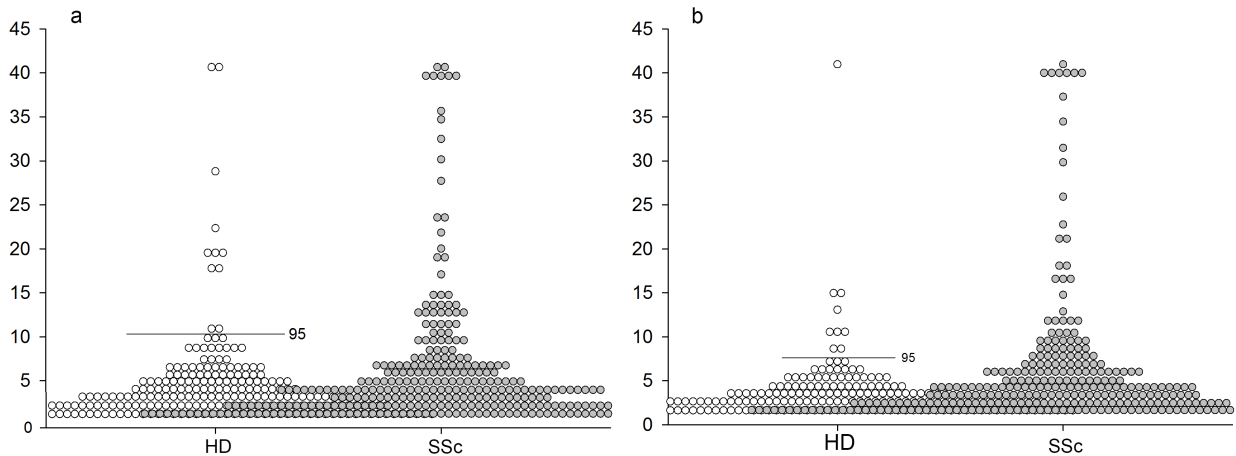
T cell isolation and chemotaxis assays

T cells were isolated by depletion of non-T cells performing magnetic activated cell sorting with the Pan T cell kit (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany). Purity of the selected populations was usually more than 95% as assessed by flow cytometry.

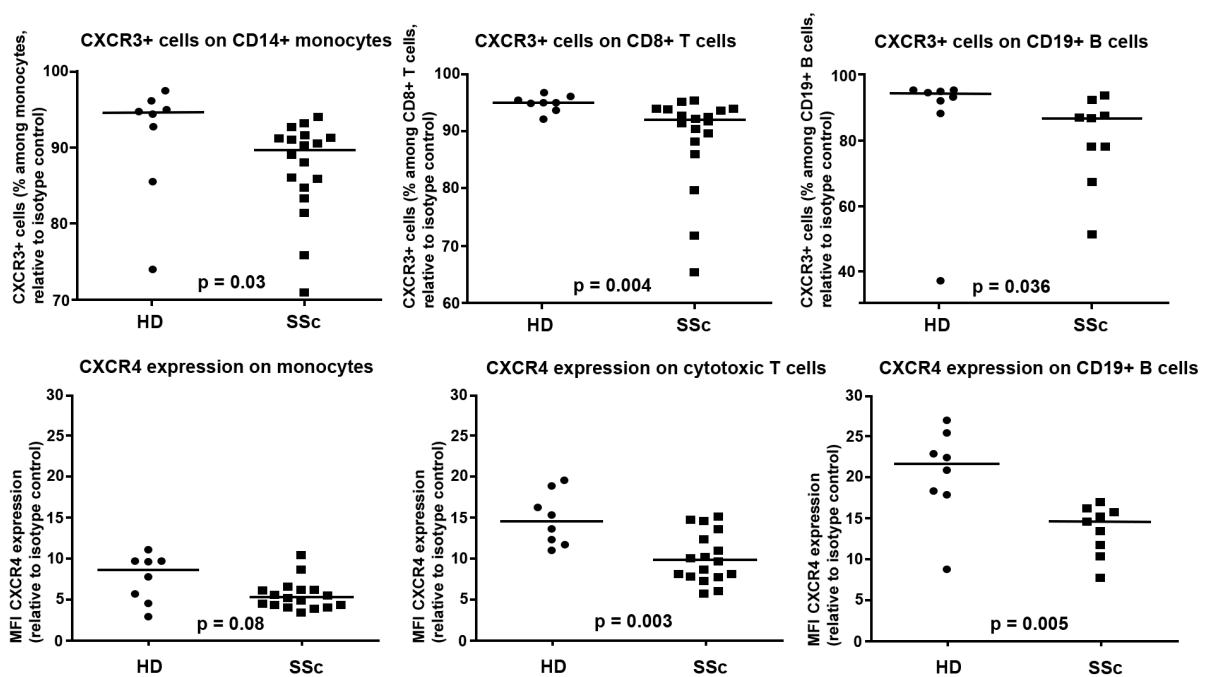
T cells were cultured overnight at a concentration of 1-2 million/mL in RPMI1640 medium with Glutamax, 1% IgG-free FCS, Penicillin 100 U/mL and Streptomycin 100 µg/mL (all PAA Laboratories, Austria) in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C. Next day cells were seeded at a concentration of 1.0-1.3 million cells/mL in anti-CD3/CD28 coated well plates (10 and 5 µg/mL, respectively, coated overnight at 4°C) and cultured for three days in the presence of IL-2 (10 µg/mL) under the conditions described above. Cells were washed in PBS/BSA and resuspended in assay medium (RPMI1640 with 0.5% BSA). Chemotaxis experiments were performed in transwell cell culture chambers with a polycarbonate membrane of 5 µm pore size (Costar Corning Incorporated, USA). 10⁶ cells in 100 µL were placed to the inserts. The inserts were positioned into individual wells containing 600 µL assay medium with or without indicated IgG at a concentration of 100 µg/mL. Receptor antagonists AMG 487 for CXCR3 (N-1-[(3-4-(Ethoxyphenyl)-3,4-dihydro-4-oxopyrido[2,3-d]pyrimidin-2-yl)ethyl]-N-(3-pyridinylmethyl)-4-(trifluoromethoxy) ben-zeneacetamide) and AMD 3100 for CXCR4 ([1-[4-(1,4,8,11-Tetrazacyclotetradec-1-ylmethyl)phenyl] methyl]-1,4,8,11-tetrazacyclo-tetradecan) were added to both the inserts and the corresponding wells at a concentration of 100 ng/µl. Appropriate concentrations of the antagonists and the IgG were determined in experiments using CXCL11 and CXCL12, the ligands for CXCR3 and CXCR4, respectively. Plates were incubated for 2 hours in

a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C. The number of cells which were migrated into the well was determined with a Neubauer hemocytometer (Marienfeld, Germany).

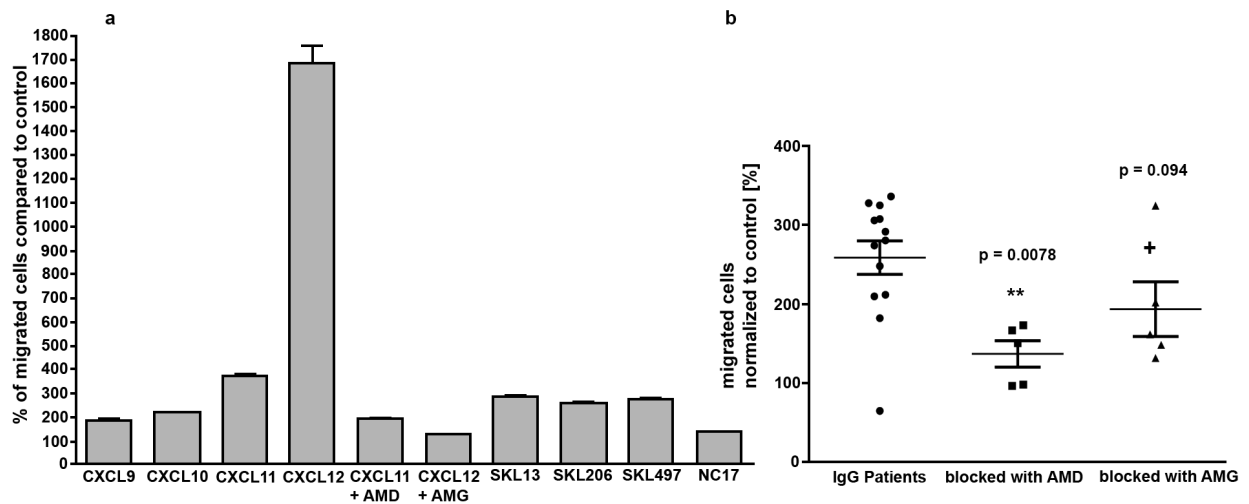
Suppl. Fig. 1 Anti-CXCR3 (a) and anti-CXCR4 ab levels (b) in healthy donors (HD) versus SSc patients.



Suppl. Fig. 2 Percentages of cells expression CXCR3 and median fluorescence intensity of cells expression CXCR4 (CD 184) in monocytes, CD8⁺ T cells, and in B cells in Healthy donors (HD) versus SSc patients. P values (Mann-Whitney U-Test).



Suppl. Fig. 3 Chemotaxis of isolated T cells is induced by the natural ligands CXCL11 and CXCL12 as well as by SSc IgG (SKL 13, 206, 497 = IgG Patient) and higher compared to IgG from healthy donors (NC 17). a) Ligand-induced migration is reduced by CXCR3 (AMD3100) and CXCR4 receptor antagonists (AMG 487). b) Chemotaxis by SSc IgG (Patient) is significantly reduced by the CXCR3 antagonist and markedly reduced by the CXCR4 antagonist. Statistical analyses were performed by Mann-Whitney U-Test (SSc IgG vs. SSc IgG plus receptor blockers), *p<0.05



Suppl. Tab. 1 Epidemiologic data of SSc patients analysed for anti-CXCR3/4 antibodies (SSc patients for ab) as well as for CXCR3/4 expression (SSc cohort expression).

Patient's data	SSc patients for ab	lcSSc	dSSc	Overlap	UCTD	SSc cohort expression
Female (%)	284 (86,9)	150 (90,4)	79 (77,5)	26 (89,7)	23 (95,8)	15 (88,2)
Male (%)	43 (13,1)	16 (9,6)	23 (22,5)	3 (10,3)	1 (4,2)	2 (11,8)
All (%)	327 (100)	166 (100)	102 (100)	29 (100)	24 (100)	17 (100)
Age in years (SD)	56.46 (14.71)	59.57 (14.71)	53.29 (14.05)	50.59 (14.78)	56.42 (11.91)	55 (11.4)
Age at diagnosis in years (SD)	48.43 (15.75)	50.48 (14.55)	45.25 (14.92)	44.29 (14.21)	51.69 (12.73)	48.4 (10.4)

Suppl. Tab. 2 Baseline lung function parameters of SSc-Patients

Parameter	Anti-CXCR3 ab analysis Mean ± std. deviation, (n)	Anti-CXCR4 ab analysis Mean ± std. deviation, (n)
VC (%)	88.3 ± 16.0 (71)	89.8 ± 16.4 (58)
FVC (%)	92.7 ± 18.6 (284)	93.2 ± 18.7 (271)
TLC (%)	98.2 ± 17.5 (253)	98.6 ± 17.6 (240)
DLCO-SB (%)	63.7 ± 17.1 (274)	64.0 ± 17.1 (261)
DLCO/VA (%)	77.4 ± 15.9 (245)	77.7 ± 15.9 (231)
FEV1 (%)	93.6 ± 17.4 (253)	93.1 ± 17.5 (265)
FEV1/VC (%)	104.9 ± 11.2 (71)	104.9 ± 11.2 (58)

Suppl. Tab. 3 Associations of SSc-Patients with CXCR3/4 ab level above 95. percentile of healthy donors (HD) with clinical symptoms.

Parameter	Prevalence	Patients with ab level > 95. percentile of HD		P values	Number of analysed patients
		with manifestation	w/o manifestation		
Anti-CXCR3 antibodies					
Joint manifestations	190 (58.1%)	29 (15,3%)	11 (8.0%)	≤ 0.05	327
Osteoarthritis	26 (9.5%)	0 (0%)	26 (13%)	≤ 0.05	273
Anti-CXCR4 antibodies					
Cardiac arrhythmias	20 (7.6%)	7 (35%)	36 (14.8%)	≤ 0.05	263
Cardiac failure	10 (3.8%)	4 (40%)	39 (15.4%)	≤ 0.05	263
Cardiovascular diseases	140 (53.2%)	30 (21,4)	13 (10,6%)	≤ 0.05	263

Suppl. Tab. 4 Median CXCR3/4 ab levels of SSc-Patients with and without clinical symptoms.

Parameter	Median ab level with manifestation (U)	Median ab level w/o manifestation (U)	P values	Number of analysed patients
Anti-CXCR3 antibodies				
Muscular weakness	4.24	3.37	≤ 0.05	321
Osteoarthritis	2.38	3.80	≤ 0.05	273
Proteinuria	1,83	3,85	≤ 0.01	321
Sec. Sjogren's syndrome	2.76	3.80	= 0.06	273
Fibromyalgia	2.2	3.76	= 0.06	273
Anti-CXCR4 antibodies				
Muscle weakness	3.43	3.12	≤ 0.05	306
Muscle pain	4.82	3.11	≤ 0.05	187
Sec. Sjogren's syndrome	2.25	3.69	≤ 0.05	263

13. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

14. Publikationsliste

Weigold F, Günther J, Pfeiffenberger M, Cabral-Marques O, Siegert E, Dragun D, Philippe A, Regensburger AK, Recke A, Yu X, Petersen F, Catar R, Biesen R, Hiepe F, Burmester GR, Heidecke H, Riemekasten G.

Antibodies against chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 predict progressive deterioration of lung function in patients with systemic sclerosis

Arthritis Res Ther. 2018 Mar 22;20(1):52

Impact Factor: 4.121

Recke A, Regensburger AK, **Weigold F**, Müller A, Heidecke H, Ludwig RJ, Riemekasten G

Autoantibodies in Serum of Systemic Scleroderma Patients: Peptide-Based Epitope Mapping Indicates Increased Binding to Cytoplasmic Domains of CXCR3

Front. Immunol., 22 March 2018,

Impact Factor: 6.429

15. Danksagung

Ich danke meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Riemekasten für die Überlassung des interessanten Themas und die gute Betreuung.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Hiepe für die formale Übernahme der Betreuung.

Ich danke meiner ganzen Familie für ihre allgegenwärtige Unterstützung.