

Aus der Klinik für Rheumatologie und Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle von Plasmablasten mit einem mukosalen
Phänotyp als Biomarker bei Systemischer Sklerose

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Georg Tilgner

aus Berlin

Datum der Promotion: 05.03.2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	8
1 Zusammenfassung	9
2 Einleitung	12
2.1 Systemische Sklerose	12
2.1.1 Epidemiologie	12
2.1.2 Klassifikation.....	12
2.1.3 Symptomatik.....	13
2.1.3.1 Frühsymptome	13
2.1.3.2 Haut	14
2.1.3.3 Organe	15
2.1.3.4 Lunge	15
2.1.3.5 Gastrointestinaltrakt	15
2.1.3.6 Niere	16
2.1.4 Diagnostik.....	16
2.1.5 Therapie	17
2.2 Pathomechanismus	18
2.2.1 B-Zellen	19
2.2.2 T-Zellen.....	23
2.2.3 Regulatorische T-Zellen	25
2.2.4 Siglec-1.....	25
2.3 Marker mukosaler Immunreaktionen	26
2.4 Fragestellung	27
3 Material und Methoden	28
3.1 Methoden	28
3.1.1 Durchflusszytometrie	28
3.2 Studiendesign	30
3.2.1 Patienten und Kontrollen	30
3.2.2 Durchführung durchflusszytometrischer Analysen	31
3.2.3 Durchflusszytometrisches Analyse-Strategie (Gating)	35
3.2.4 Statistische Analyse	37
4 Ergebnisse	38
4.1 Patientencharakteristika	38
4.2 Die absolute Anzahl der einzelnen B-Zell Subpopulationen ist im peripheren Blut von SSc-Patienten vermindert	39
4.3 Patienten mit SSc haben prozentual mehr IgA-positive Plasmablasten im peripheren Blut	40
4.4 Erhöhte relative Expression von dem mukosalen Adhäsionsmolekül $\alpha_4\beta_7$-Integrin auf Plasmablasten von SSc- Patienten	40
4.5 Die verringerte absolute Anzahl von B-Zell Subpopulationen ist mit pulmonalen Krankheitsmanifestationen assoziiert	41

4.6	Die nach B-Zell depletierender Therapie verbleibenden Plasmablasten/zellen von SSc-Patienten weisen einen mukosalen Phänotyp auf.....	44
4.7	Unter den Patienten mit SSc haben vor allem die Patienten mit pulmonaler Beteiligung eine verringerte absolute Anzahl an T-Zellen	45
4.8	Im Vergleich von naiven- und Gedächtnis-T-Zellen zeigen sich keine quantitativen Veränderungen zwischen gesunden Probanden und SSc-Patienten	49
5	<i>Diskussion</i>	50
6	<i>Literaturverzeichnis</i>	61
7	<i>Eidesstattliche Versicherung</i>	76
8	<i>Anteilerklärung an erfolgten Publikationen</i>	78
	<i>Lebenslauf</i>	79
	<i>Danksagung</i>	81

Abkürzungsverzeichnis

A			
ACR	American College of Rheumatology		
AMA	Antimitochondriale Antikörper		
ANA	Antinukleäre Antikörper		
APRIL	A proliferation inducing ligand		
B			
BAFF	B cell activating factor		
BD	Becton Dickinson		
BSA	Bovines Serumalbumin		
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit		
C			
CCR10	C-C chemokine receptor type 10		
CD	Cluster of differentiation		
CRP	C-reaktives Protein		
CT	Computertomographie		
D			
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol		
dSSc	Diffuse Systemische Sklerose		
DNSS	Deutsches Netzwerk für Sklerodermie		
DRFZ	Deutsches Rheumaforschungszentrum		
E			
ESC	European Society of Cardiology		
ESR	European Respiratory Society		
EULAR	European League against Rheumatism		
F			
FACS	Fluorescence-activated cell sorter		
G			
GAVE	Gastric antral vascular ectasia		
H			
HD	Gesunder Proband (engl. healthy donor)		
I			
IgA	Immunglobulin A		
		IL	Interleukin
		L	
		ISSc	Limitierte Systemische Sklerose
		M	
		MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
		mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
		mRSS	modified Rodnan skin score
		N	
		n	Anzahl
		NT-proBNP	N-terminale pro Brain natriuretic peptide
		P	
		PAH	Pulmonale Hypertonie
		PB	Plasmablasten
		PBC	Primär biliäre Zirrhose
		PBMC	Monokleäre Zellen des peripheren Blutes (engl. peripheral blood mononuclear cells)
		PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
		PDGF	Platelet derived growth factor
		PF	Lungenfibrose (engl. pulmonary fibrosis)
		R	
		RA	Rheumatoide Arthritis
		RTX	Rituximab
		S	
		SD	Standardabweichung
		SIBO	Small intestinal bacterial overgrowth
		SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
		SpO ₂	Pulsoxymetrisch gemessene Sauerstoffsättigung
		SSc	Systemische Sklerose
		T	
		TGF- β	Transforming growth factor β
		TNF	Tumornekrosefaktor
		Tregs	Regulatorische T-Zellen

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Veränderung der B Zell Homöostase bei Patienten mit SSc in Form einer erhöhten Frequenz naiver B-Zellen und einer verringerten Frequenz an Gedächtnis B-Zellen und Plasmablasten; modifiziert nach: Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K, Tedder TF. Altered B lymphocyte function induces systemic autoimmunity in systemic sclerosis. Molecular Immunology. 2004 Nov;41(12):1123–33 (82	20
Abbildung 2A - Prinzipskizze der durchflusszytometrischen Zellanalyse, genaue Beschreibung siehe Text; aus (133) (verändert).....	29
Abbildung 2B - Schematische Darstellung der durchflusszytometrischen Färbung zweier Parameter auf Zellen mit entsprechenden Antikörpern und deren Darstellung im zweidimensionalen Punktfeld-Analysegraphen; nach: Hoyer, Bimba Franziska. Lebensdauer autoreaktiver Plasmazellen in einem Lupus-Maus-Modell (134)	29
Abbildung 3 - Exemplarisches B-Zell-Gating der Oberflächenfärbungen. Zelldoubletten wurden anhand ihrer Laserstreuungseigenschaften exkludiert. Anschließend wurde ein Gate auf CD19+CD3-CD14- B-Zellen gelegt, die als Grundlage der weiteren B-Zell- Analysen fungierten. CD19-negative Zellen wurden nicht miteingeschlossen, da die CD19-negativen Plasmazellen im Blut deutlich seltener sind als im Knochenmark	35
Abbildung 4 - Exemplarisches Gating der IgA+ Plasmablasten (intrazelluläres Panel). B-Zellen wurden anhand ihrer CD19 Expression selektiert. Anschließend wurde ein Gate auf CD20-CD27+ Plasmablasten gelegt. Innerhalb dieser Plasmablasten wurden IgA+ und IgA- Plasmablasten histogrammbasiert differenziert	35
Abbildung 5 - Exemplarisches Gating der naiven und Gedächtnis-T-Zellen. Zelldoubletten wurden anhand ihrer Laserstreuungseigenschaften exkludiert. Anschließend wurden CD3+ CD4+ T-Zellen selektiert, anhand derer dann CD45RA positive naive T-Zellen und CD45RO positive Gedächtnis-T-Zellen bestimmt wurden	36

Abbildung 6 - Exemplarisches Gating der regulatorischen T-Zellen. Zelldubletten wurden anhand ihrer Laserstreuungseigenschaften exkludiert. In Folge dessen wurden CD3+ CD4+ T-Zellen selektiert und innerhalb dieser Zellpopulation ein Gate auf die FoxP3+ regulatorischen T-Zellen (Treg) gelegt	37
Abbildung 7 - Vergleich der absoluten und relativen Anzahlen der B-Zellen insgesamt (A), CD20+CD27- naiven B-Zellen (B), CD20+CD27+ Gedächtnis B-Zellen (C) und CD20-/geringCD27hoch Plasmablasten (D) zwischen gesunden Probanden (healthy donors, HD) und Patienten mit SSc (Systemic Sclerosis, SSc)	39
Abbildung 8 - Relative und absolute Anzahlen IgA-positiver Plasmablasten. Erhöhter relativer Anteil IgA-positiver Plasmablasten in Blutproben von Patienten, die an SSc erkrankt sind. Diese Analysen basieren auf den intrazellulären Färbungen von IgA	40
Abbildung 9 - Relative Häufigkeiten von CCR10 und $\alpha 4\beta 7$ -Integrin positiven Plasmablasten/Zellen im Vergleich zwischen gesunden Probanden (healthy donors, HD) und Patienten mit SSc (Systemic Sclerosis, SSc)	41
Abbildung 10 - Vergleich der absoluten Anzahlen der B-Zellen insgesamt (A), CD20+CD27- naiven B-Zellen (B), CD20+CD27+ Gedächtnis B-Zellen (C) und CD20-/geringCD27hoch Plasmablasten (D) zwischen gesunden Probanden und den untersuchten SSc-Patienten, aufgeteilt nach dem Vorhandensein bzw. Nicht-Vorhandensein einer pulmonalen Hypertonie (PAH) und einer Lungenfibrose (PF)	42
Abbildung 11 - Vergleich der relativen Anteile von IgA-positiven Plasmablasten zwischen gesunden Probanden (Healthy Donors, HD), SSc-Patienten mit Lungenfibrose (pulmonary fibrosis, PF) und ohne Lungenfibrose (no PF)	43
Abbildung 12 - Subanalysen der relativen Anteile von $\alpha 4\beta 7$ -Integrin positiven Plasmablasten an allen Plasmablasten von gesunden Probanden und Patienten mit SSc aufgeteilt in Patienten mit pulmonaler Hypertonie (PAH) und Lungenfibrose (pulmonary fibrosis, PF) A , Die generelle relative Expression von $\alpha 4\beta 7$ -Integrin war statistisch signifikant erhöht bei Patienten mit pulmonaler Beteiligung in der Form von pulmonaler Hypertonie oder Lungenfibrose B , Die relative Expression von $\alpha 4\beta 7$ -Integrin auf IgA-positiven Plasmablasten ist ebenfalls signifikant erhöht bei Patienten mit pulmonaler Beteiligung in der Form von pulmonaler Hypertonie oder Lungenfibrose	44

Abbildung 13 - Erhöhte Frequenz von mukosalen IgA-positiven Plasmablasten nach B-Zell depletierender Therapie. Die relative Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin ist auf den verbliebenen IgA-positiven Plasmablasten von SSc-Patienten nach der Therapie mit Rituximab signifikant erhöht im Vergleich zu gesunden Probanden und SSc-Patienten ohne Therapie mit Rituximab im Krankheitsverlauf45

Abbildung 14 - Absolute Mengen CD3+ T-Zellen im Vergleich gesunder Probanden mit SSc-Patienten bzw. deren Subformen (A) und den einzelnen pulmonalen Krankheitsmanifestationsgruppen (B). Alle untersuchten Patientengruppen wiesen signifikant weniger T-Lymphozyten auf als die gesunde Kontrollkohorte47

Abbildung 15 - Absolute Mengen CD4+ (A,B) und CD8+ (C,D) positiver T-Zellen im Vergleich gesunder Probanden mit SSc-Patienten bzw. deren Subformen (A,C) und den einzelnen pulmonalen Krankheitsmanifestationsgruppen (B,D). Bis auf die Gruppe der dSSc-Patienten maßen wir in allen untersuchten Patientengruppen signifikant weniger CD4+ bzw. CD8+ T-Lymphozyten als in der gesunden Kontrollkohorte48

Abbildung 16 - Relative Häufigkeiten naiver- (A) und Gedächtnis- (B) T-Zellen. In der Analyse beider Zellpopulationen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen gesunden Probanden und den SSc-Erkrankten insgesamt bzw. deren einzelnen Manifestationsgruppen49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Genutzte Antikörper in der Durchflusszytometrie. Die genutzten monoklonalen Antikörper in dieser Studie wurden von BD Bioscience (San Jose, CA), Biolegend (San Diego, CA), Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach, Germany), Merck (Darmstadt, Germany), R&D Systems (Abingdon, UK), Invitrogen (Carlsbad, CA) und AbD Serotec (Kidlington, UK) erworben oder vor Ort im Institut produziert und fluoreszenz-markiert (DRFZ Berlin, Deutschland)	34
Tabelle 2 - Demographische und klinische Daten	38
Tabelle 3 - Überblick der festgestellten Veränderungen im Rahmen der untersuchten Krankheitsmanifestationen	50

1 Zusammenfassung

Hintergrund: Systemische Sklerose (SSc) ist eine seltene Kollagenose, die unter anderem mukosale Organe betrifft. Der klinische Phänotyp kann stark variieren, ohne dass bisher Biomarker für einen bestimmten Phänotyp vorhanden sind. B-Zellen und Plasmablasten (PBs) spielen eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der SSc, zu erkennen an dem Vorhandensein von Autoantikörpern und der Wirksamkeit B-Zell-depletierender Therapien.

Mei et al. konnten anhand spezifischer Expressionseigenschaften wie der Expression von IgA, CCR10 und $\alpha_4\beta_7$ -Integrin - Markern mukosaler Immunreaktionen - zeigen, dass ein großer Teil der menschlichen Plasmazellen im Blut ihren Ursprung in mukosalen Immunreaktionen haben (1).

Auf diesen Markern basierend ist das Ziel unserer Studie, Veränderungen des mukosalen Immunsystems in Zusammenhang mit Symptomen von SSc Patienten zu bringen. Ein vermehrter Nachweis von Plasmablasten mit einem mukosalen Phänotyp bei Patienten mit primär mukosaler Beteiligung wäre ein erster Biomarker für diesen klinischen Phänotyp.

Methodik: Das periphere Blut und die klinischen Daten von 49 SSc Patienten (25 mit limitierter SSc; 20 mit diffuser SSc) wurden analysiert und mit 23 gesunden Probanden (HD) verglichen. Die Expression von CD19, CD20, CD27, IgM, CD95, IgD, CD138, HLA-DR, IgA, CCR7, CCR10, $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und CD62L, sowie verschiedene T-Zell- und Monozytenantikörper auf mononukleären Zellen des peripheren Blutes wurden durchflusszytometrisch untersucht.

Ergebnisse: Deutliche Unterschiede ($p=0,0085$) konnten bezüglich eines Anstieges der relativen Menge IgA+ PB bei Patienten mit SSc (Median=59,3%; $n=46$) im Vergleich zu den gesunden Probanden gefunden werden (Median=48%; $n=23$).

Interessanterweise ist dieser Anstieg bei Patienten mit Lungenfibrose (PF) (Median=66,1; $n=21$) im Vergleich zu Patienten ohne Lungenfibrose (Median=57,2%; $n=22$, $p=0,08$) und gesunden Probanden (Median=48%; $n=23$, $p=0,0024$) besonders betont.

Die relative Anzahl der mukosalen $\alpha_4\beta_7$ -Integrin+ Plasmablasten ist deutlich höher in der Gruppe der SSc Patienten (median=44,65%; $n=46$) verglichen mit den gesunden Probanden (Median=35,2%, $n=23$, $p=0,0173$). Auch dieser Anstieg $\alpha_4\beta_7$ -Integrin+

Plasmablasten ist ausgeprägter bei Patienten mit Lungenfibrose (Median=43,7%; n=21) als ohne Lungenfibrose (Median=30,45%, n=22, p=0,1585) und zusätzlich bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie (PAH) (Median=59,9%; n=10) betonter als bei Patienten ohne pulmonaler Hypertonie (Median=43,6%; n=33, p=0,0829).

Schlussfolgerung: Wir konnten einen Anstieg von Plasmablasten mukosalen Phänotyps bei Patienten mit SSc demonstrieren, der teilweise mit einer pulmonalen Beteiligung assoziiert ist. Diese Plasmablasten mukosalen Phänotyps scheinen zusätzlich eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber B-Zell-depletierender Therapie aufzuweisen bei nur wenigen untersuchten Patienten mit RTX-Therapie.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Plasmablasten mit einem mukosalen Phänotyp im peripheren Blut als Biomarker für eine mukosale/pulmonale Beteiligung der SSc verwendet werden könnten. Eventuell ergeben sich Optionen z.B. für eine Anti-Integrin-Therapie als Therapieoption in den entsprechenden Patienten-Subgruppen.

Abstract

Background: Systemic sclerosis (SSc) is a rare connective tissue disease i.e. affecting mucosal organs. B cells and plasmablasts (PBs) play a major role in the pathogenesis of SSc reflected by the presence of specific autoantibodies and the efficiency of B cell depleting therapy.

Mei et al. could show that a major part of human steady-state blood plasma cells have their origin in mucosal immune reactions, determined by their specific expression of IgA, CCR10 and $\alpha_4\beta_7$ -Integrin (1).

Based on those markers, the aim of our study is to establish a connection between alterations of the mucosal immune system and symptoms of SSc patients. An increase of plasmablasts with a mucosal phenotype in patients with primarily mucosal clinical manifestations could serve as a biomarker for mucosal involvement.

Methods: Blood and clinical data of 49 SSc patients (25 with limited Systemic Sclerosis; 20 with diffuse Systemic Sclerosis) was analysed and compared to 23 healthy donors. Expression of CD19, CD20, CD27, IgM, CD95, IgD, CD138, HLA-DR, IgA, CCR7,

CCR10, $\alpha_4\beta_7$ -Integrin and CD62L as well as several T Cell and Monocyte antibodies on mononuclear cells of the peripheral blood was analyzed by flow cytometry.

Results: Marked differences ($p=0,0085$) were found showing an increased frequency of IgA+ PBs in patients with SSc (median=59,3%, $n=46$) as compared to healthy donors (median=48%, $n=23$). Interestingly, this increase of IgA+ PB frequency is accentuated in patients with pulmonary fibrosis (PF) (median=66,1%, $n=21$) as compared to patients without PF (median=57,2%; $n=22$, $p=0,08$) and HDs (median=48%; $n=23$; $p=0,0024$).

The frequency of PBs being positive for the mucosal marker $\alpha_4\beta_7$ -Integrin is significantly higher in SSc patients (median=44,65%, $n=46$) in comparison with healthy donors (HD) (median=35,2%, $n=23$, $p=0,0173$). This increase of $\alpha_4\beta_7$ -Integrin positive PB frequency is again more pronounced in patients with PF (median=43,7%; $n=21$) as compared to patients without PF (median=30,45%, $n=22$, $p=0,1585$) and also increased in patients with pulmonary arterial hypertension (PAH) (median=59,9%; $n=10$) in comparison to patients without PAH (median=43,6%; $n=33$, $p=0,0829$).

Conclusion: We could demonstrate an increase of PBs with a mucosal phenotype in patients with SSc that is partly associated with pulmonary involvement. PBs with a mucosal phenotype seem to have an increased resistance against B cell depleting therapy in only few analysed patients.

Those findings indicate that mucosal plasmablasts could serve as biomarkers for mucosal/pulmonary involvement in SSc. The finding of a potentially pathogenically relevant cell population might serve future therapies based on anti-integrin-therapies in the corresponding subgroups of patients.

2 Einleitung

2.1 Systemische Sklerose

2.1.1 Epidemiologie

Die Systemische Sklerose (SSc) ist eine relativ seltene systemische Erkrankung aus der Gruppe der Kollagenosen. Chiffot et al. ermittelten in einer Metaanalyse eine Inzidenz zwischen 0,06 bis 12,2/100.000 Einwohner und eine Prävalenz von 0,7 bis 48,9/100.000 Einwohner (2). Die Unterschiede der Angaben sind unter anderem durch regionale Variationen zu erklären. In den USA und Australien scheint es höhere Prävalenzen als in Europa und Asien zu geben (2). Zusätzlich zeigen sich Hinweise auf regionale Anhäufungen von Erkrankungsfällen (3,4). Weitere Einflussgrößen der Krankheitsprävalenz sind Alter und Ethnie (5-7).

Bezüglich der Geschlechtsunterschiede zeigt sich bei der SSc, wie bei vielen anderen Autoimmunerkrankungen, ein deutliches Überwiegen des weiblichen Geschlechts. Die Auswertung einer spanischen Patientenkohorte ergab 2017, dass in dieser Gruppe achtmal mehr Frauen als Männer betroffen sind. Zusätzlich konstatierte diese Studie erstmals geschlechtsspezifische Prognosefaktoren (8).

Des Weiteren erhöhen einige exogene Stoffe das Risiko der Erkrankung. Eine Metaanalyse wies beispielsweise nach, dass Siliziumdioxid, ein Mineral, mit dem Arbeiter vieler Industriezweige in Kontakt kommen, zu einem erhöhten Risiko einer SSc-Erkrankung führt. Dieses ließ sich jedoch interessanterweise fast ausschließlich für Männer nachweisen (9).

Die um dem Faktor 3,5 im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöhte Mortalität hat sich zwischen 1970 und 2010 nicht signifikant verringert, wodurch die SSc weiterhin zu den rheumatologischen Erkrankungen mit einer vergleichsweise schlechten Prognose gehört. Kardiopulmonale Krankheitsmanifestationen stehen dabei als Todesursache im Vordergrund (10).

2.1.2 Klassifikation

Bezüglich der Klassifikation der SSc war lange Zeit die Einteilung von LeRoy et al. aus dem Jahr 1980 wegweisend. Sie unterschied dabei zwei große Erkrankungsuntergruppen: Zum einen die limitierte Form (lSSc- limitierte SSc), welche

sich durch eine begrenzte Hautbeteiligung, Angiopathien, Calcinosen, ösophageale Beteiligung und eher pulmonale Hypertonie als pulmonale Fibrose auszeichnet. Zum anderen die diffuse Form (dSSc- diffuse SSc), welche durch eine schnelle Fibrose der Haut, Lunge und anderer innerer Organe charakterisiert ist (11).

Vor dem Hintergrund einer geringen Sensitivität der 1980 etablierten Klassifikationskriterien, vor allem in früher SSc und der limitierten Form der SSc, wurden 2013 neue Klassifikationskriterien entwickelt. Diese entstanden aus der Zusammenarbeit des American College of Rheumatology (ACR) und der European League against Rheumatism (EULAR) und basieren auf der Etablierung eines hinreichenden und sieben zusätzlicher Parameter in einem gewichteten Klassifikationsschema für eine Klassifikation als SSc. In der Validierungskohorte dieser neuen Kriterien konnte eine deutliche bessere Sensitivität und Spezifität als in den 1980er Kriterien erreicht werden (0,91/0,92 in den 2013 Kriterien und 0,75/0,72 in den 1980er Kriterien) (12). Weiteren Studien gelang es, die Überlegenheit der neuen Klassifikationskriterien vor allem in frühen Krankheitsstadien zu belegen (13,14).

2.1.3 Symptomatik

2.1.3.1 Frühsymptome

Die frühzeitige Diagnose der SSc gestaltet sich in der klinischen Praxis auf Grund der teils unspezifischen Symptome schwierig. Daher gibt es Bestrebungen, zuverlässige Prädiktoren der Krankheitsentstehung zu erkennen und darauf basierende Screeningmethoden zu etablieren (15-17). Ziel ist es dabei, frühzeitig eine passende Therapie einzuleiten, bevor es zu signifikanten Organschäden gekommen ist. Cavagna et al. konnten 2016 zeigen, dass es eine hohe Prävalenz undiagnostizierter SSc Patienten in einer Kohorte von Patienten mit idiopathischer pulmonal arterieller Hypertonie gibt. Diese Erkenntnis unterstreicht die Notwendigkeit eines frühzeitigen interdisziplinären Angangs, um die entsprechenden therapeutischen Konsequenzen im Falle einer SSc ziehen zu können (18,19).

Die wegweisendsten Frühsymptome sind das Raynaud Phänomen und geschwollene ("puffy") Finger (20). Gibt es dabei weiterhin Auffälligkeiten in der Nagelfalzkapillarmikroskopie im Sinne eines mikrovaskulären Schadens oder krankheitsassoziierte Autoantikörper, sind diese in diesem Kontext als jeweils

unabhängige prädiktive Faktoren einer Progression zur SSc zu werten (21). Es fehlt dabei jedoch weiterhin an verlässlichen Biomarkern, welche eine Krankheitsentstehung bzw. ein Krankheitsfortschreiten prognostizieren können (22). Somit sind klinisch tätige Rheumatologen weiterhin mit der Aufgabe konfrontiert, mit einer möglichen und in der Literatur als "sehr frühen SSc" bezeichneten Krankheitsform adäquat umzugehen. Bis jetzt sind dabei im Kern engmaschige Kontrolluntersuchungen das Vorgehen der Wahl, um eine Krankheitsentwicklung und das damit verbundene Einleiten einer Therapie zu erkennen (23).

2.1.3.2 Haut

Die im Rahmen der SSc eintretende Fibrose der Haut ist ein zentrales Krankheitsmerkmal. Dabei unterscheidet man klassisch zwei Muster des Hautbefalls. Zum einen das Muster einer akral betonten, sich zentripetal bis zu den Ellenbogen/Knien ausbreitenden Hautfibrose, welche typischerweise den Rumpf ausspart und der limitierten SSc zugeordnet wird. Zum anderen wird eine fortschreitende Hautfibrose über die Ellenbogen bzw. die Knie unter Einbezug des Rumpfes im Sinne einer diffus SSc eingeordnet (11). Dabei gilt es jedoch zu beachten, dass die anhand der Hautbeteiligung abgeleitete Dichotomie der Erkrankung bezüglich Krankheitslast und Prognose nur von begrenztem Wert ist (24). Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass ein schnelles Voranschreiten der Hautfibrose mit einer erhöhten Mortalität und einem erhöhten Risiko einer renalen Krise assoziiert ist (25). Interessanterweise ist eine fehlende Regression der Hautveränderungen nicht mit einer schlechteren Prognose assoziiert (26).

Die selten auftretende SSc sine Scleroderma, also eine Erkrankungsform ohne Hautbeteiligung, ist am ehesten als Unterform der limitierten SSc zu werten (27).

Weitere mögliche kutane Manifestationen sind digitale Ulzerationen, Calcinosen, Teleangiektasien, Pruritus und Dyspigmentation (28). Die Calcinosen lassen sich wiederum in mehrere Formen unterteilen, deren klinische Relevanz noch weiter evaluiert werden muss (29).

Zur Evaluation und Quantifizierung der Hautfibrose ist klinisch der modified Rodnan skin score etabliert (30).

2.1.3.3 Organe

Die wesentlichen von der SSc betroffenen inneren Organe sind Lunge, Gastrointestinaltrakt, Herz, sowie potenziell akut bedrohlich die Niere (31).

2.1.3.4 Lunge

Pulmonal manifestiert sich die SSc vor allem in Form einer pulmonalen Fibrose und einer pulmonalen Hypertonie mit ihren jeweiligen potenziellen Auswirkungen. Die Patienten werden dabei teilweise mit Dyspnoe und verminderter Belastungsfähigkeit klinisch auffällig (32).

Die pulmonale Fibrose, auch als interstitielle Lungenerkrankung bezeichnet, ist die häufigste Todesursache der SSc. Für ein optimales Management dieser potenziell fatalen Komplikation sind lungenfunktionsdiagnostische Untersuchungen und hochauflösende Computertomographien zur Detektion und Evaluation unabdingbar (33). Versuche, Ergebnisse der bronchoalveolären Lavage oder das histopathologische Muster als prädiktiven Marker zu benutzen, waren dabei nicht erfolgreich (34,35).

Pulmonale Hypertonie (PAH) im Rahmen einer SSc ist ebenfalls mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Mehrere Mechanismen können dabei Ursache der pulmonalen Hypertonie sein. Die drei am besten Etablierten sind dabei eine Vaskulopathie der kleinen pulmonalen Arterien, eine pulmonale Fibrose mit einhergehender pulmonaler Hypoxie und eine Myokardfibrose mit konsekutiver linksventrikulärer diastolischer oder systolischer Dysfunktion (36,37). Auch hier ist die Etablierung neuer Screeningverfahren zum früheren Erkennen einer pulmonalen Hypertonie Gegenstand aktueller Forschung (38).

2.1.3.5 Gastrointestinaltrakt

Das gastrointestinale System ist bei mehr als 90% der Patienten betroffen und stellt somit die häufigste organbezogene Krankheitsmanifestation der SSc dar. Dabei kann von der Mundhöhle bis zum Anus prinzipiell jedes Organ des Gastrointestinaltraktes betroffen sein (39).

Bereits die im orofasialen Bereich auftretenden Veränderungen, wie Xerostomie und Microstomie, gehen mit einer verringerten Lebensqualität einher (40).

Das am häufigsten betroffene Organ des Gastrointestinaltraktes bei SSc ist der Ösophagus (41). Klassischerweise kommt es zu Ösophagusmotilitätsstörungen mit einem verminderten Tonus des unteren Ösophagussphinkters. Damit einhergehend kann es zu entsprechenden Komplikationen einer gastroösophagealen Refluxerkrankung wie dem Barrett Ösophagus oder Strikturen kommen (42-44). Interessanterweise lässt sich eine Korrelation zwischen der Zunahme des Durchmessers des unteren Ösophagussphinkters im Rahmen der ösophagealen Motilitätsstörung und einer voranschreitenden interstitiellen Lungenerkrankung erkennen (45).

Im Bereich des Magens sind infolge von neuropathischen und vaskulären Schäden die Entstehung einer Gastroparese oder eine Erweiterung der Venen im Antrumbereich („gastric antral vascular ectasia“, GAVE) möglich (46).

Auf Ebene des Dünndarms führt eine Stase des luminalen Inhaltes zu einer sekundären bakteriellen Fehlbesiedlung („small intestinal bacterial overgrowth“, SIBO), der mit prokinetischen und antibiotischen Medikamenten begegnet werden kann (47,48).

Der Dickdarm ist vor allem von hypomotilitätsassoziiierter Konstipation und chronischer intestinaler Pseudoobstruktion betroffen (49,50).

2.1.3.6 Niere

Der allgemeine negative Einfluss der SSc auf die Nierenfunktion ist als gering zu betrachten (51,52). Gefürchtet ist jedoch weiterhin, trotz ihrer abnehmenden Inzidenz, die renale Krise (53). Diese bei 2-15% der Patienten auftretende Komplikation, geht mit einem Blutdruckanstieg, einer verschlechterten Nierenfunktion und einer thrombotischen Mikroangiopathie einher und ist potenziell lebensbedrohlich (54).

2.1.4 Diagnostik

Wie bereits erwähnt, spielen im Rahmen der Frühdiagnostik der SSc neben Anamnese und klinischer Untersuchung vor allem die Ergebnisse der Antikörperbestimmung und Kapillarmikroskopie eine Rolle (21).

Sollte es zur Diagnose der Erkrankung kommen, gilt es initial, die Organ-, Haut-, Gelenk- und Muskelbeteiligung zu erfassen. Dazu empfiehlt sich eine möglichst standardisierte Erstuntersuchung, wie sie beispielsweise von dem Deutschen Netzwerk für Sklerodermie (DNSS) etabliert wurde (55). Auf Grund ihrer hohen Sensitivität sind Antinukleäre

Antikörper (ANA) im Rahmen eines Diagnoseausschlusses bzw. der Differenzialdiagnostik regelhaft bestimmte Parameter. Anhand der im Normalfall damit einhergehenden Bestimmung Sklerodermie-typischer Antikörper kann dann eine Frühdiagnose gestellt und ggf. bereits eine Sklerodermie-Untergruppen-Zuordnung erfolgen. Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) und C-reaktives Protein (CRP) können initial zu einer Prognoseabschätzung herangezogen werden (56).

Im Krankheitsverlauf gilt es dann, gewisse halbjährliche bzw. jährliche apparative Verlaufsuntersuchungen durchzuführen (55).

Weiterer nicht zu vernachlässigender Teil der Diagnostik ist das Erkennen von assoziierten Erkrankungen. Um die mit der SSc assoziierte primär biliäre Zirrhose (PBC) möglichst frühzeitig zu erkennen, empfiehlt sich der Nachweis ihrer Markerantikörper, der antimitochondrialen Antikörper (AMA) vom Typ M2 (57-60).

Auch das Sjögren Syndrom tritt gehäuft im Rahmen einer SSc auf. Daher empfiehlt sich aus diagnostischer Perspektive ein Schirmer Test zur Detektion einer Sicca Symptomatik und ggf. die Bestimmung der mit dem Sjögren Syndrom assoziierten Autoantikörper gegen SS-A/Ro und SS-B/La (61,62).

2.1.5 Therapie

Kernaspekt der Therapie der SSc ist die zielgerichtete Therapie der individuellen Krankheitsmanifestationen (63). Eine generelle Immunsuppression ist nicht indiziert und geht sogar mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit einer renalen Krise einher (64,65).

Genauere Behandlungsempfehlungen werden regelmäßig von den entsprechenden Fachgesellschaften publiziert, auf die an dieser Stelle bezüglich der aktuellen Therapie verwiesen sei (48,66). Im Gesamtkonzept der Therapie ist dabei das Erkennen einer Krankheitsprogression und der damit verbundene richtige Therapiezeitpunkt von wesentlicher Bedeutung. Humbert et al. konnten zeigen, dass ein standardisiertes Screeningverfahren zur Detektion der Entwicklung einer pulmonalarteriellen Hypertonie klassischer Diagnostik und Therapie überlegen ist (67).

Zentrales Problem in der Therapie ist weiterhin, dass eine einmalig eingetretene Fibrose nicht mehr rückgängig zu machen ist. Durchgeführte Studien mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib waren nicht von dem klinisch notwendigen Erfolg (68). Therapeutisch vielversprechenderer Tyrosinkinaseinhibitor scheint Nintedanib sein (69).

Somit bleibt es momentan abzuwarten, welche der in klinischer Testung befindlichen neuen Therapien zu Besserungen führen werden.

Auch aus sozioökonomischer Perspektive besteht Bedarf an neuen Therapien. Die totalen Therapiekosten variieren in Europa zwischen 11.074 € und 22.459 € jährlich und stellen somit eine Belastung für die Budgets der Gesundheitssysteme der Länder dar (70). Zwar ist davon auszugehen, dass neue Therapieformen mit primär höheren Kosten verbunden sein werden, jedoch führen eine verbesserte Lebensqualität und längere Arbeitsfähigkeit zu sowohl persönlichen als auch gesamtwirtschaftlichen Vorteilen.

2.2 Pathomechanismus

Noch immer gilt die Pathogenese der SSc als nicht vollständig erforscht. Die drei wesentlichen pathophysiologischen Mechanismen sind:

- vaskuläre Veränderungen in Form eines Verlustes der endothelialen Integrität und perivaskulärer Infiltrationen von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs),
- Autoimmunität und
- eine Proliferation des Bindegewebes (71).

Dieses Ineinandergreifen komplexer Mechanismen macht bereits deutlich, wie anspruchsvoll der Weg zum vollen Verständnis und zur Heilung der Erkrankung sein wird.

Die ersten Veränderungen im Verlauf der Krankheitsentwicklung der SSc sind vaskuläre Veränderungen, welche klinisch zumeist initial durch das Auftreten eines Raynaud Phänomens auffallen. Dieses ist als reversibler akraler Vasospasmus in einer kalten Umgebung definiert – klinisch werden die Akren weiß oder livide. Im weiteren Verlauf der Erkrankung können weitere Zeichen vaskulärer Veränderungen auftreten wie kutane Teleangiektasien oder bestimmte Umbauvorgänge der Nagelfalzkapillaren (31,72). Die perivaskulären Infiltrationen in diesem entscheidenden Stadium der Krankheitsinitiation sind durch Monozyten und aktivierte Lymphozyten charakterisiert (73,74).

Im Anschluss an diese initiale Erkrankungsphase ist der klinische Phänotyp der SSc von fibrotischen Umbauprozessen und deren Konsequenzen dominiert. Hoch komplexe Interaktionen von spezifischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren führen im Zusammenspiel mit intrinsischen Anomalien zu einer kontinuierlich aufrechterhaltenen Situation der chronischen Fibroblastenaktivierung (75).

2.2.1 B-Zellen

Die menschliche Immunantwort basiert auf den Mechanismen der angeborenen und adaptiven Immunabwehr. Die entwicklungsgeschichtlich ältere angeborene Immunabwehr verläuft im Vergleich zur adaptiven Immunabwehr zwar schneller, jedoch unspezifisch gegenüber eindringenden Erregern. Die zielgerichtete adaptive Immunreaktion basiert wiederum auf dem Ineinandergreifen einer vor allem durch T-Zellen vermittelten zellvermittelten Immunantwort und einer vor allem durch B-Zellen vermittelten humoralen Immunantwort.

B-Zellen durchlaufen in ihrem Entwicklungsprozess verschiedene Stadien und sind in der Lage Erreger/Antigen-spezifische Antikörper zu sezernieren. Im Kontext der Pathogenese der SSc spielen sie eine entscheidende und hoch komplexe Rolle. Ein wesentlicher Aspekt, an dem dies zu erkennen ist, ist das Vorhandensein von Autoantikörpern bei mehr als 95% der Patienten (76). Die krankheitsspezifischen Autoantikörper Scl-70 und Anti-Zentromer- Antikörper sind klinisch von großer Bedeutung für die Festlegung auf einen Krankheitssubtyp - ihre pathogenetische Rolle ist jedoch unklar (77). Riemekasten et al. konnten 2011 funktionelle Autoantikörper gegen den Angiotensin-Typ1-Rezeptor und den Endothelin-1 Typ-A-Rezeptor nachweisen, die bei den meisten SSc Patienten auftreten und mit der Schwere einiger Krankheitsmanifestationen korrelieren (78). Zuvor konnten bereits stimulatorische Autoantikörper gegen den PDGF-Rezeptor bei SSc nachgewiesen werden, die eine profibrotische Signalkaskade triggern (79). Antikörper gegen Fibroblasten treten ebenfalls bei SSc-Patienten auf und sind mit der interstitiellen Lungenerkrankung assoziiert (80). Somit gibt es diverse Hinweise für eine potenzielle Rolle von Autoantikörpern in der Pathogenese der SSc.

Frühere Untersuchungen konnten demonstrieren, dass die Herabregulation der B-Zell-Funktion im Mausmodell der SSc, der so genannten "tight skin mouse", zu einer Verbesserung der Hautfibrose führt. Dieser Effekt ist in frühen Phasen des Krankheitsprogresses betonter als in späten Phasen (81).

Eine wichtige Entdeckung von Sato et al. sind die verhältnismäßigen Veränderungen in der Zusammensetzung der B-Zell-Subtypen. Während SSc-Patienten eine erhöhte Frequenz und absolute Zahl an naiven B-Zellen aufweisen, ist die Frequenz und absolute Zahl der Gedächtnis-B-Zellen und Plasmablasten reduziert. Dieses Phänomen kann möglicherweise mit der erhöhten Expression des Apoptose-induzierenden Fas-

Rezeptors CD95 auf Gedächtnis-B-Zellen und deren damit einhergehenden erhöhten Apoptose-Neigung erklärt werden. Zusätzlich konnten sie eine erhöhte Expression des pro-stimulatorischen Oberflächenproteins CD19 auf naiven und Gedächtnis B-Zellen von Patienten mit SSc demonstrieren (82) (Abbildung 1).

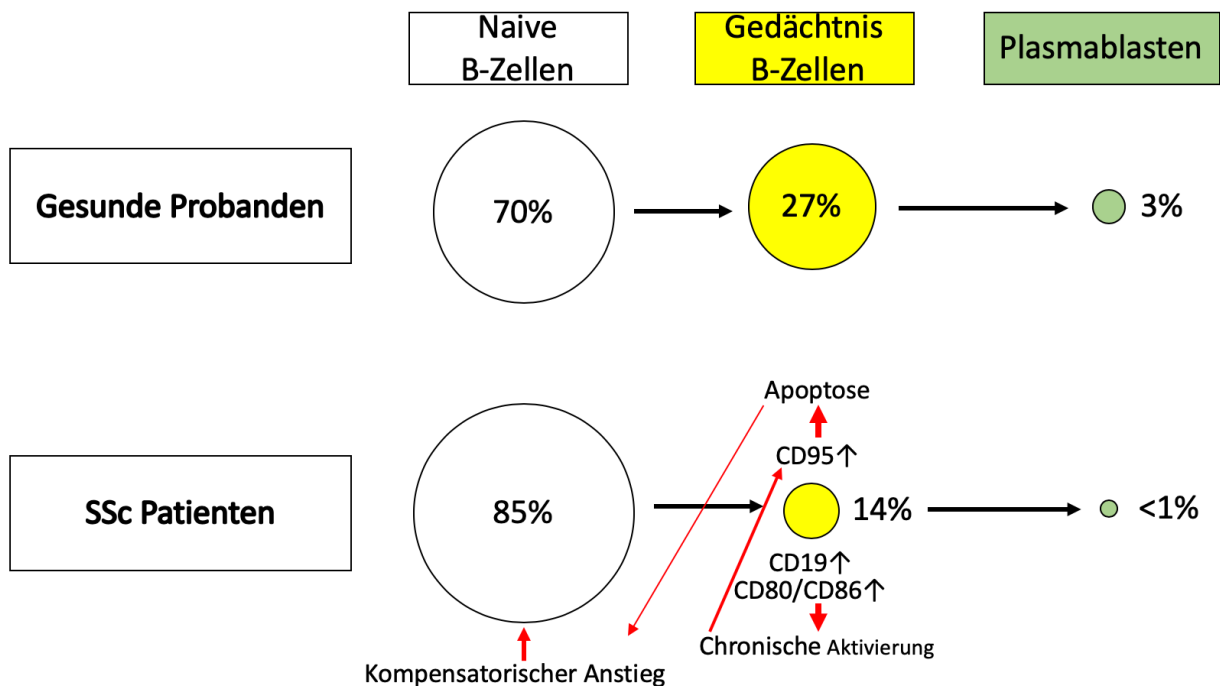


Abbildung 1 Veränderung der B-Zell-Homöostase bei Patienten mit SSc in Form einer erhöhten Frequenz naiver B-Zellen und einer verringerten Frequenz an Gedächtnis B-Zellen und Plasmablasten; modifiziert nach: Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K, Tedder TF. Altered B lymphocyte function induces systemic autoimmunity in systemic sclerosis. *Molecular Immunology*. 2004 Nov;41(12):1123–33 (82)

Über diese phänotypischen Veränderungen der B-Zellen hinaus, entsteht eine weitere Ebene an Komplexität durch die Interaktion der B-Zellen mit ihrem Zytokinmilieu.

Auf der einen Seite scheinen bestimmte Zytokine einen Einfluss auf B-Zellen und die Krankheitsentwicklung zu haben. Besonders interessant sind hier zwei Zytokine aus der TNF-Superfamilie, namentlich der „B cell activating factor“ (BAFF) und „a proliferation inducing ligand“ (APRIL).

Bei der SSc korrelieren erhöhte BAFF-Spiegel positiv mit dem Ausmaß der Hautfibrose und ein Anstieg der BAFF-Spiegel konnte mit dem Beginn oder der Verschlechterung einer Organbeteiligung assoziiert werden (83). April-Spiegel waren signifikant erhöht bei Patienten mit SSc und korrelierten nicht mit BAFF-Spiegeln (84).

Auf der anderen Seite haben B-Zellen selbst und deren assoziierte Zytokine einen Einfluss auf andere Zellen und somit die Krankheitsmechanismen der SSc.

Aktivierte B-Zellen sezernieren Interleukin (IL)-6 und IL-10, welche CD4-positive T-Helfer-Zellen Typ 2 (TH2-Zellen) induzieren. Diese TH2-Zellen produzieren wiederum die Zytokine IL-4-, IL-6 und IL-13, welche die Kollagensynthese humaner Fibroblasten stimulieren (85). Eine erhöhte Kollagensynthese geht indessen mit einer Gewebsfibrose einher, welche ein zentrales Kennzeichen der SSc darstellt.

Darüber hinaus stimuliert das von aktivierten B-Zellen produzierte IL-6 direkt die Kollagensynthese und korreliert mit dem Ausmaß der Hautfibrose. Ergänzend inhibiert der transforming growth factor β (TGF- β), welcher ebenfalls von aktivierten B-Zellen produziert wird, den Kollagenabbau (86). Weiter scheinen B-Zellen einen direkten stimulierenden Effekt auf die Kollagensynthese auszuüben. Forschung aus dem Jahr 2013 konnte zeigen, dass die Co-Kultivierung isolierter B-Zellen von gesunden Probanden oder SSc-Patienten mit humanen dermalen Fibroblasten deren Kollagensynthese signifikant erhöht. Die Co-Kultivierung von PBMCs der gleichen Gruppen mit humanen dermalen Fibroblasten hingegen ruft den Effekt der erhöhten Kollagensynthese nicht hervor (86).

Zusätzlich scheinen B-Zell depletierende Therapien, zum Beispiel mit Rituximab, einen positiven Effekt auf Patienten mit SSc zu besitzen, auch wenn große Studien diesbezüglich noch fehlen (87).

Rituximab ist ein monoklonaler Antikörper gegen CD20, welches von pro-B-Zellen bis hin zu Gedächtnis B-Zellen auf der Oberfläche exprimiert wird (88). Durch das Auslösen der Apoptose dieser Zellen spielt Rituximab eine wichtige Rolle in der Therapie vieler rheumatischer Erkrankungen. Obwohl es weiterhin eine off-label Therapie für die SSc darstellt, wird Rituximab in der Therapie von Patienten mit SSc beim Vorliegen von Kontraindikationen für oder fehlendem Ansprechen auf konventionelle Therapien angewandt (88). Vor allem in frühen Stadien der Erkrankung zeigte Rituximab einen positiven Einfluss in Bezug auf die Verzögerung der Auftretens einer Hautfibrose (89). Weiterhin übt Rituximab einen stabilisierenden Einfluss auf die Mikrozirkulation der Patienten in einer frühen Krankheitsphase aus (90) und reduziert das Voranschreiten der Lungenfibrose (13). Auch bei Patienten mit einer begleitenden Myositis sind positive Effekte beschrieben (91).

In den folgenden Ausführungen werden unter dem Begriff „Plasmablasten“ Plasmablasten und Plasmazellen zusammengefasst, da eine genaue Trennung beider Populationen oft nicht möglich ist.

Mukosale Veränderungen

Zentraler Betrachtungspunkt im Rahmen dieser Studie war das mukosale Immunsystem und dessen Einfluss auf und Zusammenhang mit dem klinischen Verlauf der SSc.

Das mukosale Immunsystem steht in wechselseitiger Beeinflussung mit den geschätzten 50 Billionen (überwiegend) Bakterien, die das sogenannte Mikrobiom bilden. Es ist bekannt, dass Veränderungen des Mikrobioms in Zusammenhang mit rheumatischen Erkrankungen stehen (92,93). Die meisten der Interaktionen zwischen dem Mikrobiom und dem Immunsystem finden im Darm statt. Davon ausgehend sind mukosale Lymphozyten jedoch in der Lage, in auch weit entfernte Orte des menschlichen Körpers zu migrieren (94). Ein Beispiel solcher Interaktionen liegt in der Erkenntnis erhöhter Antikörperspiegel gegen *Porphyromonas gingivalis* im Serum von Patienten mit einer Rheumatoiden Arthritis (RA) und Parodontitis (95). Ein erhöhtes Vorkommen des Bakteriums führt zum Auftreten von anti-CCP-Antikörpern (cyclische citrullinierte Peptide). Eine Behandlung einer durch dieses Bakterium verursachten Parodontitis führt sowohl zu einer Abnahme der Antikörperspiegel gegen cyclische citrullinierte Peptide und *Porphyromonas gingivalis*, als auch der Krankheitsaktivität der RA-Patienten (96).

Prozesse dieser Art spielen ebenfalls eine Rolle im Rahmen der SSc. Volkmann et al. konnten eine für die SSc-spezifische Zusammensetzung des Mikrobioms des Darmes identifizieren. Bestimmte Bakterien wie *Fusobacterium*, *Prevotella* und γ -*Proteobacteria* Gattungen waren im Darm von SSc-Patienten im Vergleich zu Gesunden signifikant erhöht. Andere Bakterien, vor allem *Faecalibacterium* und Clostridien-Gattungen, waren bei SSc-Patienten im Vergleich zu Gesunden signifikant vermindert. Die Menge von *Fusobacterium* war besonders stark im Mikrobiom der Patienten mit moderaten bis schweren gastrointestinalen Symptomen erhöht im Vergleich mit Patienten mit nur leichten oder keinen gastrointestinalen Symptomen. Aus der Studie ausgeschlossen wurden SSc-Patienten mit zusätzlich diagnostizierter chronisch entzündlicher Darmerkrankung (97).

Im selben Jahr konnte eine andere Gruppe von Wissenschaftlern eine Dysbiose des Mikrobioms bei 75,5% von 98 untersuchten SSc-Patienten nachweisen. Diese Veränderungen der intestinalen bakteriellen Besiedlung waren mit gastrointestinalen und

extraintestinalen Manifestationen der Erkrankung und sogar erhöhten Entzündungsmarkern im Blut assoziiert (CRP, Haptoglobin und andere) (98).

Weiterer Hinweis auf den mukosalen pathogenetischen Einfluss auf die Erkrankung wurde durch zwei Studien erbracht. In einem kleineren und einem größeren SSc-Patientenkollektiv von 10 bzw. 55 Patienten konnte eine klinische Verbesserung von Symptomen nach probiotischen bzw. antibiotischen Interventionen, die die Zusammensetzung des dysbiotischen Mikrobioms modifizierten, gezeigt werden (94,95).

In der Betrachtung der klinischen Symptome konzentrieren wir uns in den folgenden Ausführungen im Wesentlichen auf pulmonale Symptome. Dies ist zum einen vor allem darin begründet, dass es aktuell kein verbreitetes Scoring-System einer gastrointestinalen Krankheitsbeteiligung gibt und damit eine Quantifizierung der Beteiligung schwierig ist. Zum anderen ist davon auszugehen, dass die große Mehrheit der Patienten, möglicherweise subklinisch, eine gastrointestinale Beteiligung aufweist.

Des Weiteren mehren sich die Erkenntnisse, dass das mukosale Immunsystem als solches durch ein enges Wechselspiel mukosaler und gastrointestinaler Immunreaktionen geprägt ist. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass Veränderungen des intestinalen Mikrobioms direkten Einfluss auf pulmonale Erkrankungen haben. Vor diesem Hintergrund engmaschiger wechselseitiger Interaktionen entstand das Konzept der immunologischen Darm-Lungen Achse (99-102).

2.2.2 T-Zellen

T-Zellen sind neben den vorherig beschriebenen B-Zellen ein wesentlicher Bestandteil der adaptiven Immunantwort. Neben der Koordination der humoralen Immunantwort der B-Zellen sind sie vor allem für die zellvermittelte Zytotoxizität zuständig.

Grundsätzlich teilt man die T-Zellen in zwei große Gruppen, die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, ein. Aus den naiven CD4⁺ T-Zellen können wiederum abhängig vom präsentierten Antigen und dem umgebenden Zytokinmilieu spezifische T-Helferlymphozyten (u.a. Th1, Th2, Th9, Th17, Th22) oder regulatorische T-Zellen entstehen. Anhand charakteristischer Zytokinmuster kann jede dieser Untergruppen spezielle Reaktionen in der Immunantwort hervorrufen. Th1-Zellen produzieren Interferon- γ , IL-2 und Tumor-Nekrose-Faktor- β (TNF- β) und unterstützen darauf basierend die zellvermittelte Immunität und Phagozyten-abhängige Entzündung. Th2

Zellen vermitteln hingegen vor allem durch die Zytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13 antikörperabhängige Reaktionen und die Akkumulation eosinophiler Granulozyten (103).

Indizien eines pathogenetischen Einflusses der T-Zellen auf die SSc finden sich zum einen in ihrem partiell aktivierten Phänotyp. Betrachtungen des Th1/Th2 Gleichgewichts bei der SSc lieferten Hinweise darauf, dass es zu einer verstärkten Th2-Immunantwort kommt (104,105).

In Ergänzung zu der lange vorherrschenden Th1/Th2 geprägten dichotomen Sicht auf T-Helfer-Zellen wurden bereits im Jahr 2000 IL-17 produzierende Zellen entdeckt, die sich weder als Th1- noch als Th2-Zellen klassifizieren lassen und somit als Th17-Zellen etabliert wurden (106). Bei an SSc erkrankten Patienten konnte wiederum gezeigt werden, dass eine erhöhte IL-17 Produktion mitverantwortlich für die krankheitsassoziierte Induktion der Fibroblastenproliferation ist (107).

Über den beschriebenen aktivierten Phänotyp hinaus liefert das Vorhandensein von T-Zellen am Ort der Fibrose selbst einen Hinweis auf ihren pathogenetischen Einfluss (104).

Bereits 1977 konnten Fleischmajer et al. im Rahmen ihrer Analyse der Zellinfiltrate in der Haut von SSc-Patienten Lymphozyten erkennen. Mehrere spätere Studien konnten speziell T-Lymphozyten in diesen Infiltrationen nachweisen (108-110). 2017 konnte gezeigt werden, dass die Menge der CD8⁺CD25⁻ T-Zellen im peripheren Blut und der betroffenen Haut mit dem Ausmaß der Hautfibrose positiv korreliert. Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Studie ein profibrotischer Phänotyp dieser CD8⁺CD25⁻ T-Zellen beschrieben, da diese durch die ausgeprägte Produktion von IL-13 eine erhöhte Kollagensynthese der Fibroblasten verursachen (111). Die Rolle der CD8⁺ T-Zellen konnte ebenfalls in einer weiteren Studie bekräftigt werden, in der gezeigt wurde, dass CD226^{hoch}CD8⁺ T-Zellen bei Patienten mit SSc signifikant erhöht sind. Diese Zellen mit hochregulierter CD226-Expression produzieren mehrere Pathogenese-relevante Zytokine, wie das profibrotische IL-13 (112). Dagegen gibt es ebenfalls Hinweise dafür, dass der Anteil CD8⁺ und CD8⁺CD45⁺ Gedächtnis-T-Zellen bei Patienten mit SSc vermindert ist (113).

Aus klinischer Perspektive ist die T-Zell gerichtete Therapie weniger verbreitet als die B-Zell gerichtete. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Verwendung des anti-CD25 Antikörpers Basiliximab zu dermalen und pulmonalen Verbesserungen bei der SSc führen kann (114,115).

2.2.3 Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen (Tregs) sind ein wichtiger Bestandteil der Mechanismen zur Limitierung adaptiver Immunantworten. Ihre Homöostase unterliegt dabei komplexen Mechanismen und Interaktionen, die ihren regulierenden Einfluss ermöglichen (116). Während es in der Literatur unterschiedliche Beobachtungen bezüglich der quantitativen Veränderungen der regulatorischen T-Zellen bei SSc gibt, gilt die Erkenntnis einer verminderten funktionellen Kapazität dieser Zellen bei SSc als allgemein anerkannt (117). Radstake et al. konnten zeigen, dass auch regulatorische T-Zellen gesunder Probanden im Serum von Patienten mit SSc keinerlei suppressive Eigenschaften mehr aufwiesen. Daraus schlossen sie, dass die genannte verminderte funktionelle Kapazität der regulatorischen T-Zellen durch lösliche Faktoren aus dem Plasma der SSc vermittelt wird (118).

Ein weiterer Erklärungsansatz für die Dysfunktion der regulatorischen T-Zellen liegt in X-chromosomalen Inaktivierungsmechanismen. Diese Mechanismen führen dazu, dass ausgewählte Informationen aus bestimmten Teilen des Erbgutes im Kern der Zellen nicht oder nur abgeschwächt weitergegeben werden. Foxp3, ein bedeutsamer Transkriptionsfaktor für die Entwicklung und Funktion der regulatorischen T-Zellen, wird im Zuge solcher Prozesse vermindert transkribiert und regulatorische T-Zellen insgesamt in ihrem Aktivitätsniveau eingeschränkt (119).

2015 gewannen MacDonalds et al. die Erkenntnis, dass regulatorische T-Zellen in der Haut von SSc-Patienten einen Th2 ähnlichen Phänotyp einnehmen und profibrotische Zytokine sezernieren (120). Somit gibt es insgesamt aktiven Fortschritt in dem Verständnis der Rolle regulatorischer T-Zellen im Rahmen der SSc, jedoch weiteren Forschungsbedarf.

2.2.4 Siglec-1

Das Adhäsionsmolekül Siglec-1 (CD169, Sialoadhesin) wurde erstmals auf Zellen der Monozyten/Makrophagen-Reihe entdeckt und spielt eine regulierende Rolle auf Funktionen des angeborenen und adaptiven Immunsystems (121-123). Wesentlicher Einfluss auf die Siglec-1-Regulation wird dabei von Typ1-Interferonen, wie Interferon α , ausgeübt.

York et al. konnten 2007 zeigen, dass Siglec-1 auf Monozyten von SSc Patienten erhöht exprimiert wird und es daher auch eine Typ-1-Interferon vermittelte pathogenetische

Komponente geben könnte (124) – ähnlich wie beim systemischen Lupus Erythematoses. Später konnte zusätzlich gezeigt werden, dass eine verstärkte Siglec-1 Expression positiv mit einer Zunahme des modified Rodnan skin score (mRSS), einer klinisch verbreiteten manuellen Messmethode zur Quantifizierung der Hautfibrose, korreliert (125).

2.3 Marker mukosaler Immunreaktionen

Unter anderen Arbeitsgruppen konnten Mei et al. zeigen, dass ein großer Teil der menschlichen Plasmazellen ihren Ursprung in mukosalen Immunreaktionen haben, zu erkennen an ihren spezifischen Expressionscharakteristika von IgA, C-C chemokine receptor type 10 (CCR10) und $\alpha_4\beta_7$ -Integrin (1,126,127).

Der Klassenwechsel der B-Zellen vollzieht sich in mukosalen Geweben hauptsächlich unter dem Einfluss von TGF- β . $\alpha_4\beta_7$ -Integrin ermöglicht es Plasmablasten in mesenteriale Lymphknoten, intestinale Lamina propria und Peyersche Plaques zu migrieren und somit letztendlich die intestinalen Aktionsorte des Immunsystems und sekundären lymphoiden Gewebe zu erreichen (128). CCR10, ein Chemokinrezeptor, ermöglicht Plasmablasten die Migration in alle mukosalen Gewebe auf der Grundlage bestimmter Chemokinrezeptor-Interaktionen (129).

Darüber hinaus konnte eine Studie bei Patienten mit Rotavirus zeigen, dass die Expression von CCR10 und $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf B-Zellen ein Indikator für den Ursprung der Plasmablasten in einer mukosalen Immunreaktion ist (130).

Unsere eigene Arbeitsgruppe konnte in der Vergangenheit zeigen, dass die Anzahl IgA+ Plasmablasten bei Patienten mit aktiver Granulomatose mit Polyangiitis erhöht ist - einer Erkrankung mit einer gehäuften Beteiligung der nasalen Mukosa und der Lunge und hier wahrscheinlich eine Aktivierung des mukosalen Immunsystems widerspiegelt (131). Vor kurzem konnte eine weitere Studie demonstrieren, dass das mukosale Immunsystem ebenfalls beim SLE überaktiviert ist und die entsprechenden Zellen auch im entzündeten Gewebe zu finden sind (129).

Obwohl eine frühere Studie bereits in 2014 feststellte, dass eine Erhöhung des Serum IgA Spiegels mit einem erhöhten Risiko einer PAH bei SSc Patienten assoziiert ist (132), wurde die Rolle des mukosalen Immunsystems bei der SSc bis heute nicht genauer analysiert.

2.4 Fragestellung

In dieser Arbeit sollen phänotypische Unterschiede von Lymphozyten des peripheren Blutes zwischen Patienten mit ISSc, dSSc und gesunden Probanden untersucht werden. Die dabei vor allem zu beantwortenden Fragen sind:

- Finden sich bei SSc Patienten vermehrt B-Zellen mit einem Phänotyp, der auf einen mukosalen Ursprung hinweist?
- Korrelieren diese Veränderungen mit klinischen Symptomen und dabei insbesondere mit der Beteiligung mukosaler Organe?
- Und zuletzt: eignen sich diese Zellen somit als Biomarker für den entsprechenden klinischen Phänotyp?

3 Material und Methoden

3.1 Methoden

3.1.1 Durchflusszytometrie

Das Durchflusszytometer (engl. Fluorescence-activated cell sorter, FACS) ist ein etabliertes Verfahren zur Bestimmung und Differenzierung verschiedener Zellpopulationen anhand charakteristischer Oberflächen- oder intrazellulärer Proteine unter Verwendung spezifischer monoklonaler Antikörper. Das von uns verwendete FACS Canto II (BD Biosciences, San Jose, CA) zeichnet sich dabei durch die Fähigkeit zur Messung von bis zu acht Parametern für wissenschaftliche Zwecke aus.

Vom Prinzip her werden die zu untersuchenden Zielstrukturen zuerst auf aufbereiteten mononukleären Zellen des peripheren Blutes markiert. Die Markierung erfolgt durch monoklonale Antikörper, welche an spezielle Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind, oder spezielle Antikörper, welche daraufhin durch fluoreszenzmarkierte Anti-Immunglobulin-Antikörper gebunden werden. Die markierten Zellen werden in einem größeren Volumen Flüssigkeit im Durchflusszytometer durch eine kleine Düse getrieben und bilden daraufhin einen dünnen Strahl, in dem die Zellen einzeln durch das Durchflusszytometer „geschossen“ werden. Dabei passieren die Zellen einen speziellen Laser, der dabei zwei Aufgaben besitzt. Zum einen wird das Licht des Lasers auf eine für jede Zelle spezifische Art und Weise vor- und seitwärts gestreut (Forward-Sideward-Scatter). Zum anderen werden die Fluoreszenzfarbstoffe, welche an die Zellen gebunden sind, durch den Laser angeregt und so zum Fluoreszieren gebracht. Photomultiplier im Gerät detektieren nun einerseits das gestreute Licht, wodurch sie Informationen zur Granularität und Größe der Zelle gewinnen, und andererseits fluoreszierendes Licht, welches Rückschlüsse auf die Menge des gebundenen jeweiligen Antikörpers und somit der entsprechenden Proteinexpression zulässt.

Die gemessenen Daten werden in zweidimensionalen Diagrammen aufbereitet visualisiert und durch mehrfaches Markieren spezieller Zellpopulationen lassen sich Subpopulationen darstellen und quantifizieren.

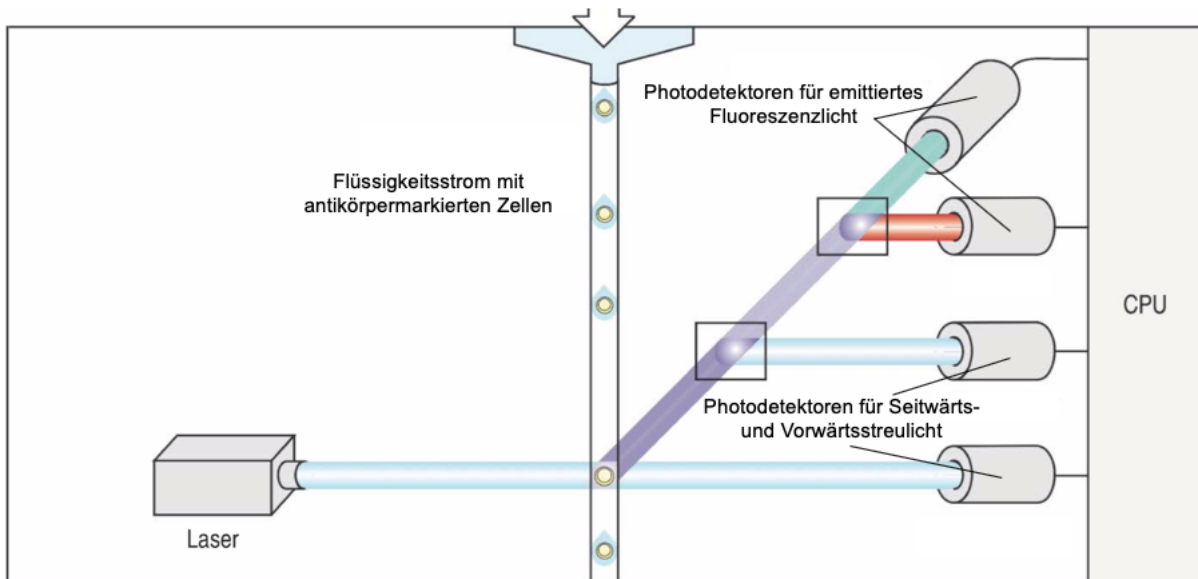


Abbildung 2A Prinzipskizze der durchflusszytometrischen Zellanalyse, genaue Beschreibung siehe Text; aus (133) (verändert)

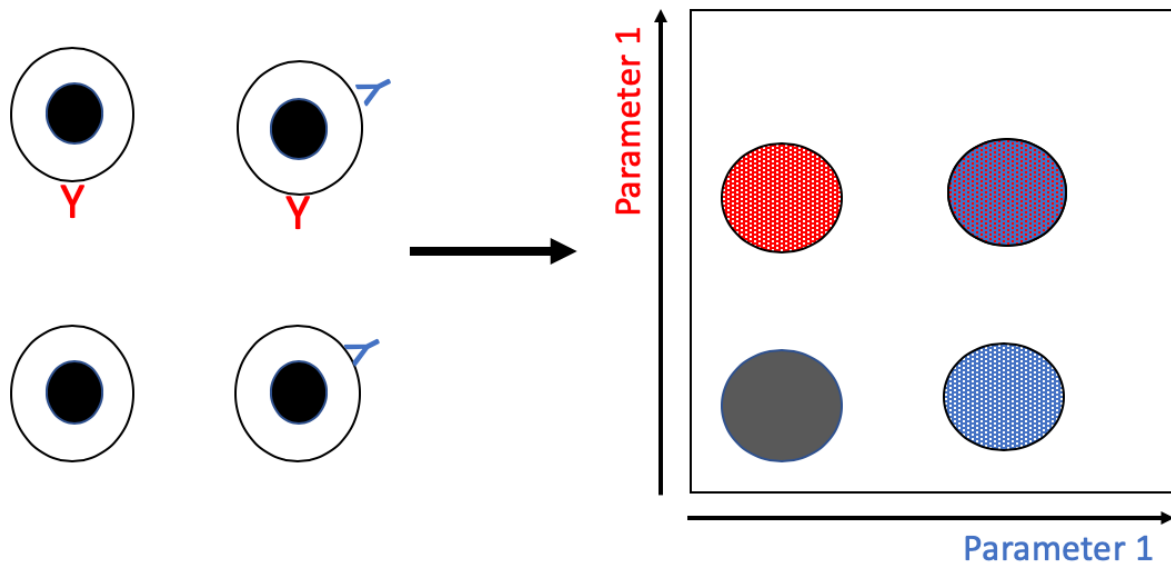


Abbildung 2B Schmatische Darstellung der durchflusszytometrischen Färbung zweier Parameter auf Zellen mit entsprechenden Antikörpern und deren Darstellung im zweidimensionalen Punktfeld-Analysegraphen; nach: Hoyer, Bimba Franziska. Lebensdauer autoreaktiver Plasmazellen in einem Lupus-Maus-Modell (134).

3.2 Studiendesign

Um die Frage nach den entsprechenden Veränderungen des Immunphänotyps zu beantworten, wurden im Rahmen einer Durchflusszytometriestudie verschiedene Lymphozytenpopulationen im peripheren Blut von Patienten mit SSc und gesunden Kontrollprobanden miteinander verglichen.

Der erste Proband wurde am 22.03.2017 und der letzte Proband am 10.08.2017 in die Studie eingeschlossen und untersucht. Fast alle Blutproben wurden dabei direkt von mir abgenommen. Die komplette Aufarbeitung und Messung der Proben wurden von mir durchgeführt.

Die Bewilligung der Studie wurde im Einklang mit der Declaration of Helsinki von der Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin erteilt (EA1/083/16). Alle Patienten und Probanden haben entsprechend der Vorgaben ihre Einwilligung zur Studienteilnahme gegeben.

3.2.1 Patienten und Kontrollen

Zum Zeitpunkt der Blutentnahme waren alle 49 Patienten mit SSc in ambulanter oder stationärer Therapie an der Charité Universitätsmedizin Berlin. Basierend auf klinischen und/oder serologischen Kriterien gab es 25 Patienten mit limitierter SSc (lSSc) und 20 Patienten diffuser SSc (dSSc) (71). Drei Patienten erhielten im Beobachtungszeitraum maximal 6 Monate vor dem Zeitpunkt der Analyse eine Therapie mit Rituximab als B-Zell depletierender Therapie und wurden deswegen separat analysiert. Eine Patientin mit früher SSc konnte auf Grund von nicht-ausreichenden charakteristischen Subgruppenmerkmalen keiner Krankheitsgruppe zugeordnet werden.

Die wesentlichen klinischen Parameter von Interesse waren pulmonale Hypertonie, Lungenfibrose und gastroösophageale Beteiligung.

Basierend auf den 2015 Leitlinien der European Society of Cardiology (ESC) und European Respiratory Society (ESR) wurde pulmonale Hypertonie definiert als Anstieg des mittleren pulmonal arteriellen Drucks $\geq 25\text{mmHg}$ in Ruhe, gemessen in einem Rechtsherzkatheter oder entsprechenden Hinweisen im Rahmen einer Echokardiographie (135).

Lungenfibrose wurde anhand von milchglasartigen Dichteanhebungen oder anderen interstitiellen Lungenpathologien in CT-Aufnahmen entsprechenden pulmonalen

Verschattungen im Lungenröntgen identifiziert. Alle entsprechenden Patienten wiesen eine verminderte pulmonale Diffusionskapazität auf.

Gastroösophageale Beteiligung wurde definiert als Diarrhoe, Dysphagie oder Ösophagusmotilitätsstörungen.

Die gesunden Probanden (n=23, mittleres Alter $41,4 \pm 16,9$ Jahre; weiblich: 17 (74%); männlich 6 (26%)) zeigten keine Anzeichen einer akuten Infektion oder immunologischen Störung.

3.2.2 Durchführung durchflusszytometrischer Analysen

Periphervenöse Blutproben wurden in Lithium Heparine Vacuette™ Röhrchen (Greiner Bio One, Frickenhausen, Germany, catalog number: 455084) und ein Z Serum Separator Clot Activator tube Vacuette™ Röhrchen (Greiner Bio One, Frickenhausen, Germany, catalog number: 456010) abgenommen.

Die Serumröhrchen wurden gemäß der Herstelleranweisungen zentrifugiert und das gewonnene Serum wurde bei -20°C innerhalb des Tages der Blutabnahme eingefroren. Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) wurden mit Hilfe einer Dichte-Gradienten-Zentrifugation mittels Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) in Leucosep™ Tubes (Greiner Bio One, Frickenhausen, Germany, catalogue number: 89048-938) gewonnen. Zu Beginn werden 15ml Ficoll für 30 Sekunden bei 1000g zentrifugiert, um die Ficoll-Schicht unter die Polypropylenscheibe des Leucosep™ Tubes zu „verschieben“. Das Vollblut wird 1:1 mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (Deutsches Rheumaforschungszentrum, DRFZ) verdünnt und in das Leucosep™ Tube gegeben. Anschließend wird das Röhrchen für 15 Minuten bei 800g und Raumtemperatur ohne Verwendung einer Zentrifugenbremse zentrifugiert. Hierbei setzen sich die mononukleären Zellen (PBMC) als Ring ab. Sie können abgenommen und in ein neues 50ml Tube transferriert werden. Von nun an lagern die Zellen auf Eis und kalte Puffer werden verwendet. Die gewonnenen PBMC werden mit PBS/0,2% bovines Serumalbumin (BSA) (DRFZ) auf 50 ml aufgefüllt, und im Anschluss für 10 Minuten bei 400g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und die Zellen in 50ml PBS/0,2%BSA (DRFZ) resuspendiert und erneut bei 400g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und das PBMC-Pellet resuspendiert.

Daraufhin erfolgt eine Zellzählung und Trypan-Blau basierte Viabilitätstestung. Aus dem eingesetzten Vollblut ergaben sich Zellzahlen zwischen 0,5 und 2×10^6 lebendige Zellen pro μl .

Die Oberflächenantigene werden durch Co-Inkubation von circa 5×10^6 PBMCs mit der entsprechenden Menge Antikörper für 15 Minuten bei 4°C in PBS/0,2%BSA gefärbt. Nachfolgend werden die Zellen zweimal mit 1ml PBS/0,2%BSA gewaschen. In den B-Zell Panels 1 und 2 (siehe Tabelle 1) werden tote Zellen direkt vor der Messung im Durchflusszytometer durch eine Färbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) ($2\mu\text{g/ml}$) in einer 1:1000 Lösung detektiert. Im Rahmen der späteren Analysen werden diese Zellen elektronisch ausgeschlossen.

Das intrazelluläre B-Zell-Panel (siehe Tabelle 1) wird in einer Lösung von 1:800 mit dem Fixable Viability Dye eFluor™780 (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts) im Kühlschrank für 15 Minuten gefärbt und anschließend in 10ml PBS/0,2%BSA resuspendiert. Daraufhin wird die Lösung gemäß den Instruktionen des Herstellers für 10 Minuten bei 4°C und 400g zentrifugiert, bevor die Zelloberflächenfärbung durchgeführt werden.

Das intrazelluläre IgA des intrazellulären B-Zell-Panels wird unter Anwendung des eBioscience™ Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer set (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts) gefärbt. Wie vom Hersteller empfohlen, werden zuerst 1ml Fix/Perm Konzentrat zu dem entsprechenden Tube hinzugefügt. Anschließend werden die Zellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln gefärbt. Im nächsten Schritt werden 2ml Fix/Perm Puffer hinzugefügt und das Tube wird für 10 Minuten bei Raumtemperatur und 500g zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und die Zellen vorsichtig resuspendiert. Anschließend wird der IgA-Antikörper in $100\mu\text{l}$ Fix/Perm Puffer hinzugefügt und die Zellen werden nochmals für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln gefärbt. Nun werden 2ml Fix/Perm Puffer hinzugefügt und noch einmal für 10 Minuten bei Raumtemperatur und 500g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Dieser Schritt wird zweimal durchgeführt, bevor die Zellen in $300\mu\text{l}$ PBS resuspendiert werden. Schließlich erfolgt die Messung der Zellen an einem FACS Canto II (BD Biosciences, San Jose, CA) unter Verwendung der Facs Diva Software version 6 (BD Biosciences, San Jose, CA). Die Daten werden mit Hilfe der FlowJo software version 10 (TreeStar, Ashland, OR) analysiert. Zelldoubletten werden in diesem Prozess unter anhand ihrer charakteristischen Scattereigenschaften exkludiert.

Die absoluten B- und T-Zell-Anzahlen wurden unter Verwendung von BD Trucount™ Rörchen (BD Biosciences, San Jose, CA) gemäß der Hersteller-Empfehlungen und Antikörpern gegen CD45, CD19 und CD3 bestimmt. Diese Antikörper wurden mit 50µl Vollblut gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 450µl der BD FACS lysis solution (1:10 in destilliertem Wasser verdünnt) hinzugefügt, die Suspension vorsichtig vermischt und bis zur Messung bei Raumtemperatur gelagert. Die Menge der jeweiligen Zellen dieses Versuches wurden zur Berechnung absoluter Zellzahlen verschiedener Zell-Unterpopulationen pro Blutvolumen genutzt.

Zielantigen	Fluorochrom	Klon	Hersteller
B Zell Panel 1			
CD19	PE-Cy7	SJ25c1	Biologend
CD20	PerCP	2H7	Biologend
CD27	Cy5	2E4	DRFZ
IgM	PE	MHM-88	Biologend
CD95	APC-Fire 750	DX2	Biologend
IgD	Fitc	IA6-2	BD
CD3	Alexa 405	Okt3	DRFZ
CD14	Pacific Blue	TM1	DRFZ
B Zell Panel 2			
CD19	PE-Cy7	SJ25c1	Biologend
CD20	PerCP	2H7	Biologend
CD27	Cy5	2E4	DRFZ
CD138	PE	B-B4	Miltenyi
HLA-DR	APC-Fire 750	L243	Biologend
IgA	Fitc	M24A	Milipore
CD3	Alexa 405	Okt3	DRFZ
CD14	Pacific Blue	TM1	DRFZ
B Zell Panel intrazellulär			
CD19	PE-Cy7	SJ25c1	Biologend
CD20	PerCP	2H7	Biologend
CD27	Cy5	2E4	DRFZ
IgA intrazellulär	Fitc	M24A	Milipore
CCR10	PE	#314305	R&D Systems
HLA-DR	APC-Fire 750	L243	Biologend
α₄β₇ Integrin	PECy5	FIB504	BD
CD62L	Vioblue	145/15	Miltenyi Biotec
Treg Panel			
CD8	Pacific Orange	3B5	Invitrogen
CD4	PerCP	SK3	BD
CD25	PeCy7	BC96	Biologend
CD62L	BV421	DRRG-56	Biologend

CD3	Fitc	UCHT1	DRFZ
FoxP3 intrazellulär	PE	259D/C7	BD
Helios intrazellulär	APC	22F6	eBioscience
T Gedächtniszellen Panel			
CCR7	Fitc	150503	R&D Systems
CD45RA	PE-Cy7	L48	BD
CD4	Cy5	TT1	DRFZ
CD31	PE	WM59	Biologend
CD45RO	Pacific Blue	UCHL1	Biologend
CD3	PerCP	SK7	BD
CD8	Pacific Orange	3B5	Invitrogen
Beriglobin (160mg/ml)			DRFZ
Siglec Panel			
CD169 (Siglec)	PE	7-239	ABD Serotec
CD56	BV510	HCD56	Biologend
CD14	Pacific Blue	TM1	DRFZ
CD3	Pacific Orange	Okt3	DRFZ
CD19	BV510	SJ25C1	Biologend
CD123	Fitc	Lot:5161114281	Miltenyi
HLA DR	PerCp	L243	Biologend
CD1c	PeCy7	L161	Biologend
CD11c	APC	REA618	Miltenyi
CD16	APC Fire750	3G8	Biologend
Berglobin (160mg/ml)			DRFZ

Tabelle 1 Genutzte Antikörper in der Durchflusszytometrie

Die genutzten monoklonalen Antikörper in dieser Studie wurden von BD Bioscience (San Jose, CA), Biologend (San Diego, CA), Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach, Germany), Merck (Darmstadt, Germany), R&D Systems (Abingdon, UK), Invitrogen (Carlsbad, CA) und AbD Serotec (Kidlington, UK) erworben oder vor Ort im Institut produziert und fluoreszenz-markiert (DRFZ Berlin, Deutschland).

3.2.3 Durchflusszytometrisches Analyse-Strategie (Gating)

Exemplarische Gatings der wesentlichen Zellpopulationen sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.

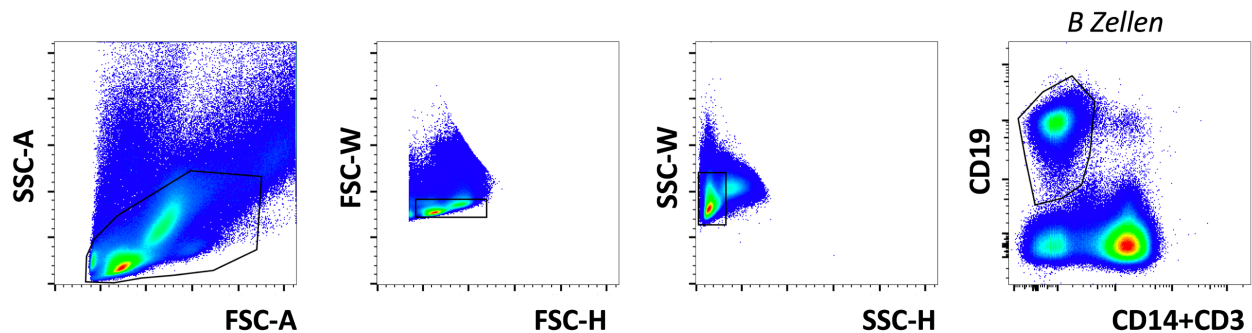


Abbildung 3 Exemplarisches B-Zell-Gating der Oberflächenfärbungen. Zelldubletten wurden anhand ihrer Laserstreuungseigenschaften exkludiert. Anschließend wurde ein Gate auf CD19+CD3-CD14- B-Zellen gelegt, die als Grundlage der weiteren B-Zell-Analysen fungierten. CD19-negative Zellen wurden nicht miteingeschlossen, da die CD19-negativen Plasmazellen im Blut deutlich seltener sind als im Knochenmark.

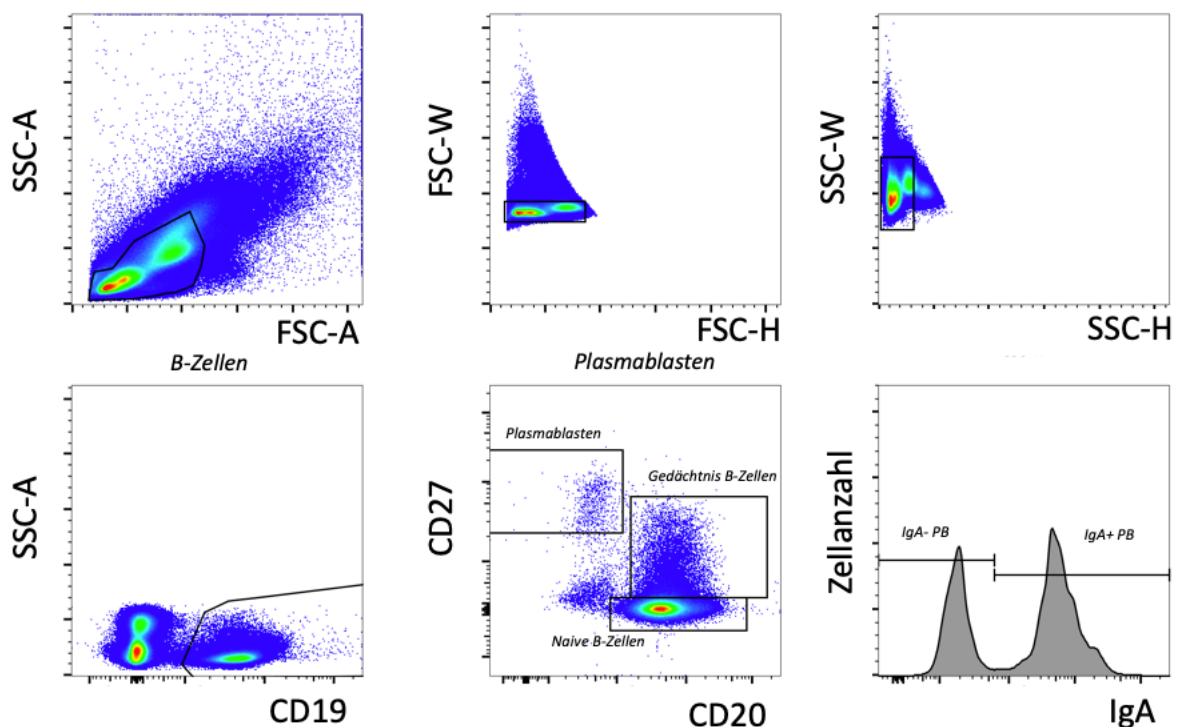


Abbildung 4 Exemplarisches Gating der IgA+ Plasmablasten (intrazelluläres Panel). B-Zellen wurden anhand ihrer CD19 Expression selektiert. Anschließend wurde ein Gate auf CD20-CD27+ Plasmablasten gelegt. Innerhalb dieser Plasmablasten wurden IgA+ und IgA- Plasmablasten histogrammbasiert differenziert.

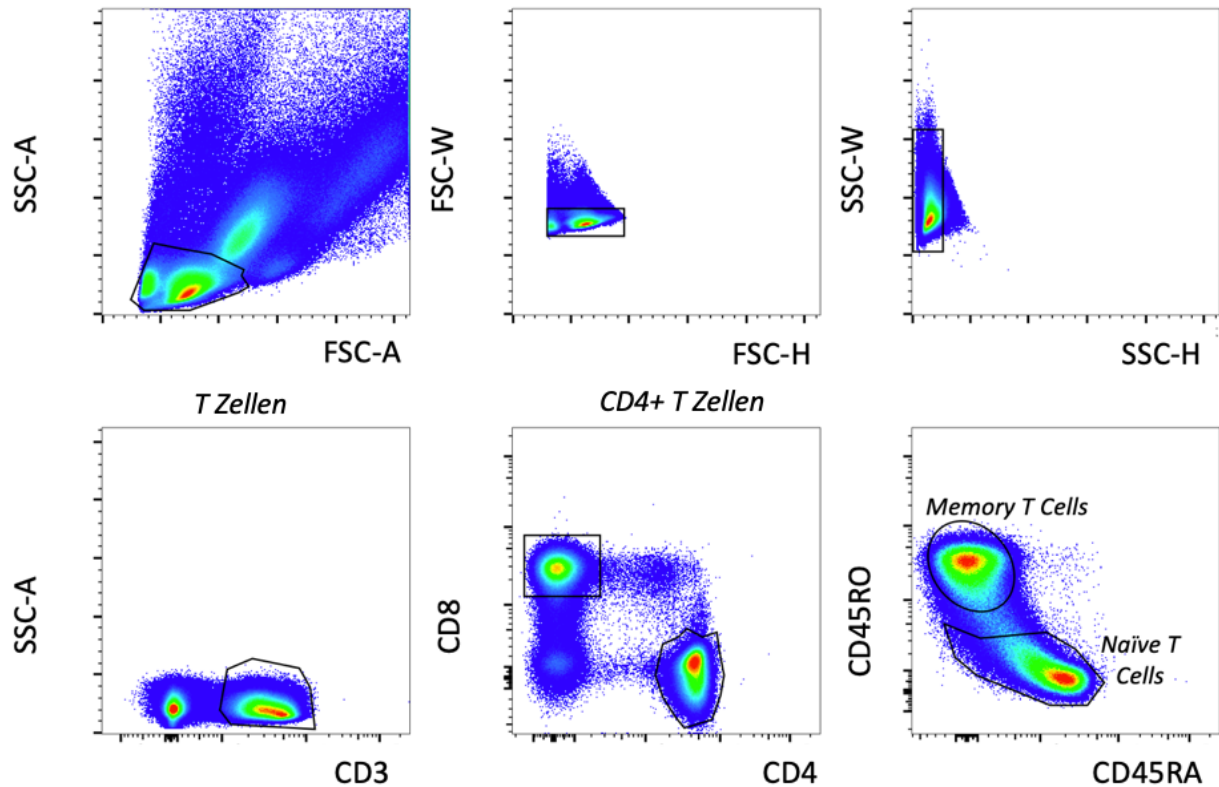


Abbildung 5 Exemplarisches Gating der naiven und Gedächtnis-T-Zellen. Zelldubletten wurden anhand ihrer Laserstreuungseigenschaften exkludiert. Anschließend wurden CD3+ CD4+ T-Zellen selektiert, anhand derer dann CD45RA positive naive T-Zellen und CD45RO positive Gedächtnis-T-Zellen bestimmt wurden.

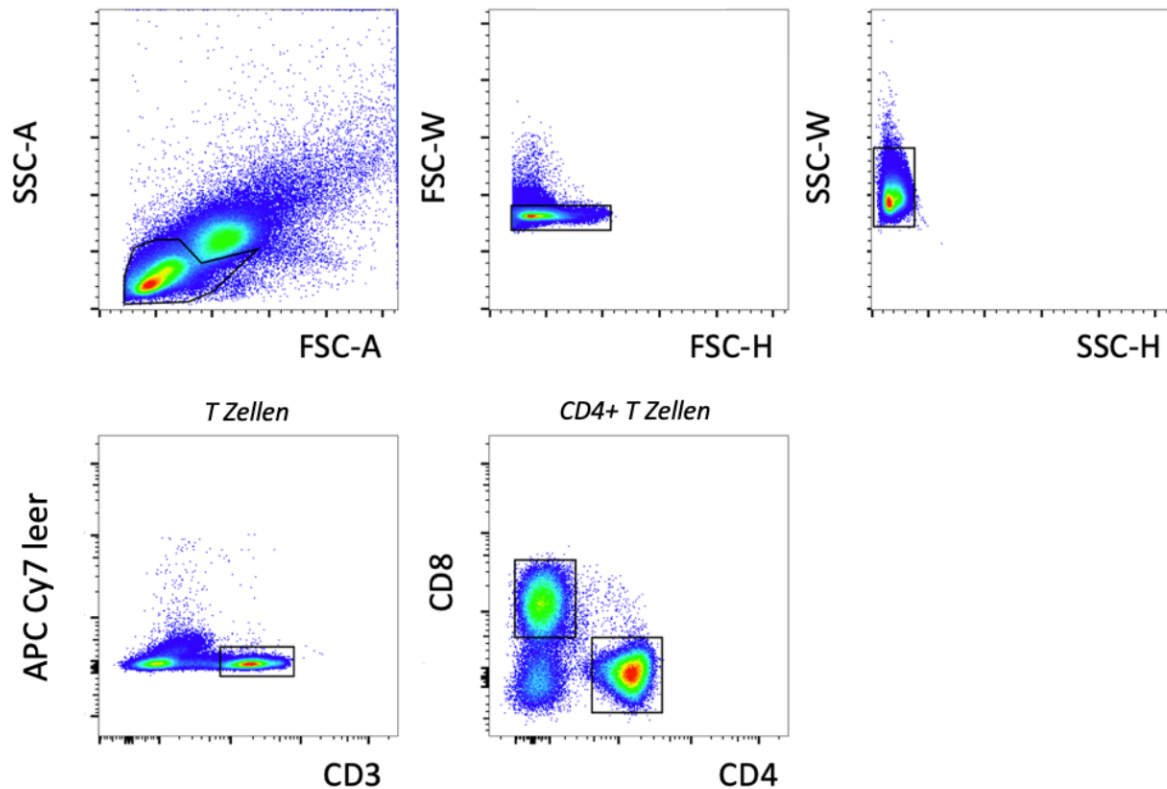


Abbildung 6 Exemplarisches Gating der regulatorischen T-Zellen. Zelldoubletten wurden anhand ihrer Laserstreuungseigenschaften exkludiert. In Folge dessen wurden CD3+ CD4+ T-Zellen selektiert und innerhalb dieser Zellpopulation ein Gate auf die FoxP3+ regulatorischen T-Zellen (Treg) gelegt.

3.2.4 Statistische Analyse

Sowohl die statistische Auswertung als auch die Herstellung der abgebildeten Graphen erfolgte mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism version 7 (Graph Pad, San Diego, CA, USA). Da eine Gaußsche Normalverteilung der Daten nicht in allen Fällen bestätigt werden kann, wurden die statistischen Gruppenvergleiche unter Verwendung des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Tests (zweiseitig) durchgeführt. Unterschiede wurden als signifikant eingeschätzt, wenn die p-Werte niedriger als 0,05 waren. Spearman's zweiseitige Regressionsanalyse wurde durchgeführt, um statistische Korrelation zwischen zwei Variablen zu analysieren bzw. detektieren. Auch dabei wurden p-Werte unterhalb von 0,05 als signifikant gewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Patientencharakteristika

Demographische und klinische Informationen der Studienteilnehmer sind in *Tabelle 2* zusammengefasst.

	ISSc (n=25)	dSSc (n=20)
Alter , Durchschnittswert \pm SD	61,6 \pm 12,1	56,2 \pm 13,3
Weibliches Geschlecht , n (%)	22 (88)	14 (70)
Krankheitsdauer in Jahren , Durchschnittswert \pm SD	10 \pm 9	9 \pm 6
SSc Manifestation , n (%)		
- Gastroösophageale Beteiligung	16 (64)	11 (55)
- Pulmonale Hypertension	8 (32)	4 (20)
- Lungenfibrose	6 (24)	15 (75)
Medikamentöse Therapie , n (%)		
- Glukokortikoide	6 (24)	7 (35)
- mit Immunsuppressiva generell	13 (52)	13 (65)
- Cyclophosphamid im Krankheitsverlauf erhalten	3 (12)	11 (55)
- Tocilizumab	0	3 (15)
- Hydroxychloroquine	4 (16)	2 (10)
- Rituximab im Krankheitsverlauf erhalten	1 (4)	2 (10)
- Ciclosporin	0	2 (10)
- Azathioprin	1 (4)	4 (20)
- Calciumantagonisten	8 (32)	7 (35)
- Endothelinrezeptorantagonisten	6 (24)	3 (15)
- Methotrexat	4 (16)	3 (15)
- Mycophenolat Mofetil	2 (8)	1 (5)

Tabelle 2 Demographische und klinische Daten
ISSc, limitierte SSc; dSSc, diffuse SSc

4.2 Die absolute Anzahl der einzelnen B-Zell Subpopulationen ist im peripheren Blut von SSc-Patienten vermindert

SSc-Patienten zeigen eine verringerte absolute Anzahl an B-Zellen im peripheren Blut (gesunde Probanden $209 \pm 111,2$ Zellen/ μl (Median/SD) vs. SSc-Patienten 129 ± 129 Zellen/ μl (Median/SD), $d=0,62$ (Cohen's d), $p=0,0092$) (Abbildung 7). Gleichzeitig besteht auf absoluter Ebene eine signifikante Reduktion der naiven B-Zellen (gesunde Probanden $184,8 \pm 105$ Zellen/ μl (Median/SD) vs. SSc-Patienten $90,7 \pm 116$ Zellen/ μl (Median/SD), $d=0,51$ (Cohen's d), $p=0,0069$) und Gedächtnis B-Zellen (gesunde Probanden $46,6 \pm 37,9$ Zellen/ μl (Median/SD) vs. SSc-Patienten $26,2 \pm 30,8$ Zellen/ μl (Median/SD), $d=0,69\%$ (Cohen's d), $p=0,0021$) bei SSc-Patienten, wohingegen die absolute Anzahl der Plasmablasten etwas erhöht ist (gesunde Probanden $1,3 \pm 1,7$ Zellen/ μl (Median/SD) vs. SSc-Patienten $1,5 \pm 2,9$ Zellen/ μl (Median/SD), $d=0,14$ (Cohen's d), $p=0,2742$) (Abbildung 7). Die Zusammensetzung der einzelnen B-Zell-Subpopulationen auf relativer Ebene unterschied sich nicht signifikant zwischen SSc-Patienten und gesunden Probanden (Abbildung 7). Nichtsdestotrotz zeigten einige SSc-Patienten einen Anstieg in der Frequenz ihrer Plasmablasten (15 der SSc-Patienten wiesen mehr als 2% Plasmablasten unter den gesamt CD19-B-Zellen auf), der bis zu 15% Plasmablasten der B-Zellen insgesamt ging (Abbildung 7).

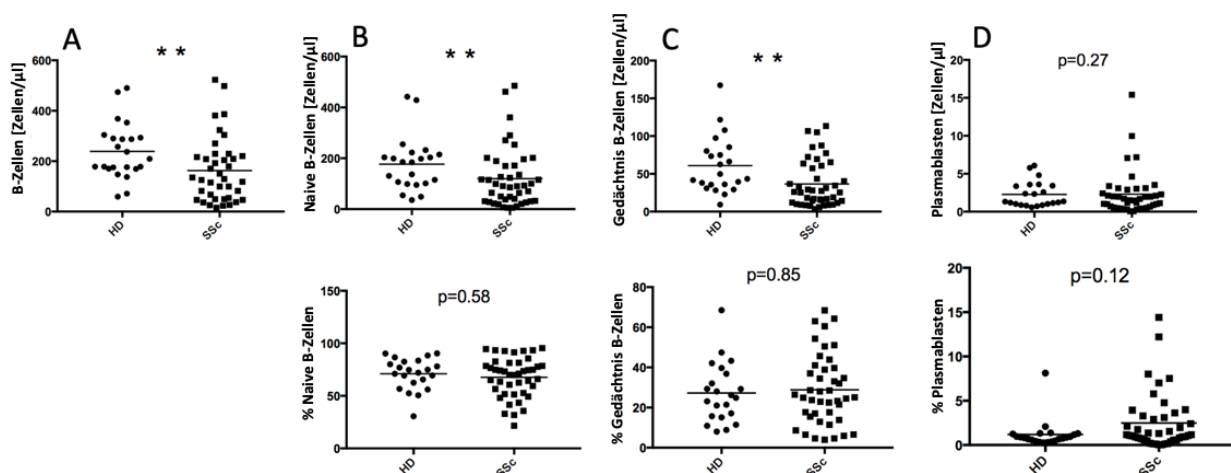


Abbildung 7 Vergleich der absoluten und relativen Anzahlen der B-Zellen insgesamt (A), CD20+CD27- naiven B-Zellen (B), CD20+CD27+ Gedächtnis B-Zellen (C) und CD20-/geringCD27hoch Plasmablasten (D) zwischen gesunden Probanden (healthy donors, HD) und Patienten mit SSc (Systemic Sclerosis, SSc).

4.3 Patienten mit SSc haben prozentual mehr IgA-positive Plasmablasten im peripheren Blut

Die Frequenz IgA-positiver Plasmablasten ist bei Patienten mit SSc erhöht (gesunde Probanden $48 \pm 10,9$ % (Median/SD) vs. SSc-Patienten $59,3 \pm 10,2$ % (Median/SD), $d=0,7$ (Cohen's d), $p=0,0085$). Dieser Anstieg auf relativer Ebene lässt sich jedoch nicht auf absoluter Ebene demonstrieren (Abbildung 8).

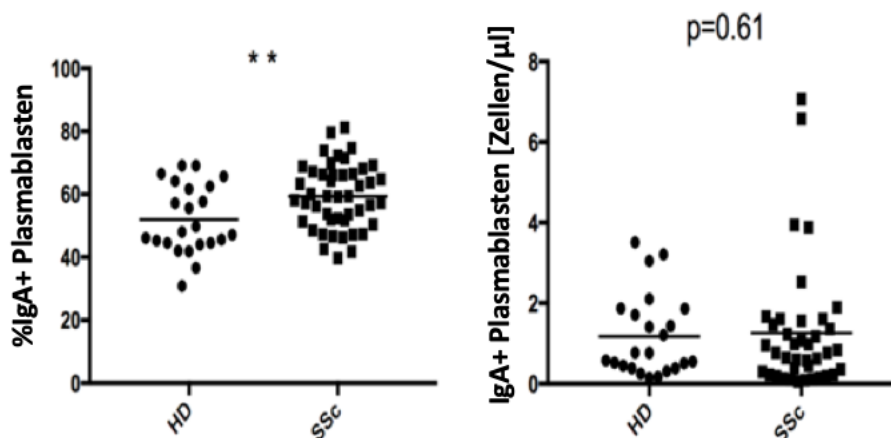


Abbildung 8 Relative und absolute Anzahlen IgA-positiver Plasmablasten. Erhöhter relativer Anteil IgA-positiver Plasmablasten in Blutproben von Patienten, die an SSc erkrankt sind. Diese Analysen basieren auf den intrazellulären Färbungen von IgA.

4.4 Erhöhte relative Expression von dem mukosalen Adhäsionsmolekül $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf Plasmablasten von SSc-Patienten

Während der relative Anteil CCR10 exprimierender Plasmablasten im Vergleich zwischen Patienten mit SSc und gesunden Probanden ähnlich war (gesunde Probanden $34,3 \pm 8,6$ % (Median/SD) vs. SSc-Patienten $33 \pm 15,02$ % (Median/SD), $p=0,9$), war der relative Anteil $\alpha_4\beta_7$ -Integrin exprimierender Plasmablasten deutlich höher bei Patienten mit SSc verglichen mit gesunden Probanden (gesunde Probanden $35,2 \pm 17,2$ % (Median/SD) vs. SSc-Patienten $44,65 \pm 19,1$ % (Median/SD), $d=0,6$ (Cohen's d), $p=0,0173$) (Abbildung 9).

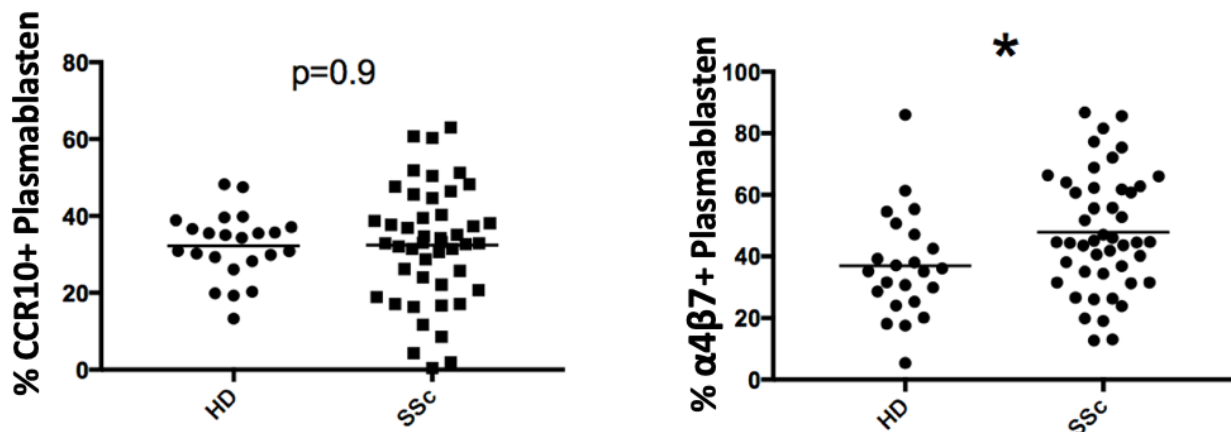


Abbildung 9 Relative Häufigkeiten von CCR10 und $\alpha_4\beta_7$ -Integrin positiven Plasmablasten/Zellen im Vergleich zwischen gesunden Probanden (healthy donors, HD) und Patienten mit SSc (Systemic Sclerosis, SSc).

4.5 Die verringerte absolute Anzahl von B-Zell Subpopulationen ist mit pulmonalen Krankheitsmanifestationen assoziiert

Wir konnten demonstrieren, dass SSc-Patienten mit pulmonaler Beteiligung in Form einer pulmonalen Fibrose oder pulmonalen Hypertonie bestimmte Veränderungen im Phänoytp und der Verteilung bestimmter Populationen unter ihren B-Zellen aufweisen. Es fällt auf, dass die B-Zellen insgesamt (gesunde Probanden $209 \pm 111,2$ Zellen/ μl (Median/SD) vs. SSc-PAH-Patienten $54 \pm 86,8$ Zellen/ μl (Median/SD), $d=1,5$ (Cohen's d), $p=0,0004$), (gesunde Probanden $209 \pm 111,2$ Zellen/ μl (Median/SD) vs. SSc-PF-Patienten 82 ± 129 Zellen/ μl (Median/SD), $d=0,9$ (Cohen's d), $p=0,0013$), die naiven B-Zellen (gesunde Probanden $184,8 \pm 105$ Zellen/ μl (Median/SD) vs. SSc-PAH-Patienten $31,8 \pm 83,8$ Zellen/ μl (Median/SD), $d=1,26$ (Cohen's d), $p=0,0004$) (gesunde Probanden $184,8 \pm 105$ (Median/SD) vs. SSc-PF-Patienten $50 \pm 111,5$ Zellen/ μl (Median/SD), $d=0,8$ (Cohen's d), $p=0,0012$) und die Gedächtnis B-Zellen (Gesunde $46,6 \pm 37,9$ Zellen/ μl (Median/SD) vs. SSc PAH Patienten $13 \pm 19,4$ Zellen/ μl (Median/SD), $d=1,4$ (Cohen's d), $p=0,0005$) (gesunde Probanden $46,6 \pm 37,9$ Zellen/ μl (Median/SD) vs. SSc-PF-Patienten $13 \pm 47,8$ Zellen/ μl (Median/SD), $d=0,4$ (Cohen's d), $p=0,0005$) besonders ausgeprägt bei den Patienten mit Lungenfibrose bzw. pulmonaler Hypertonie in ihrer absoluten Anzahl reduziert waren (Abbildung 10).

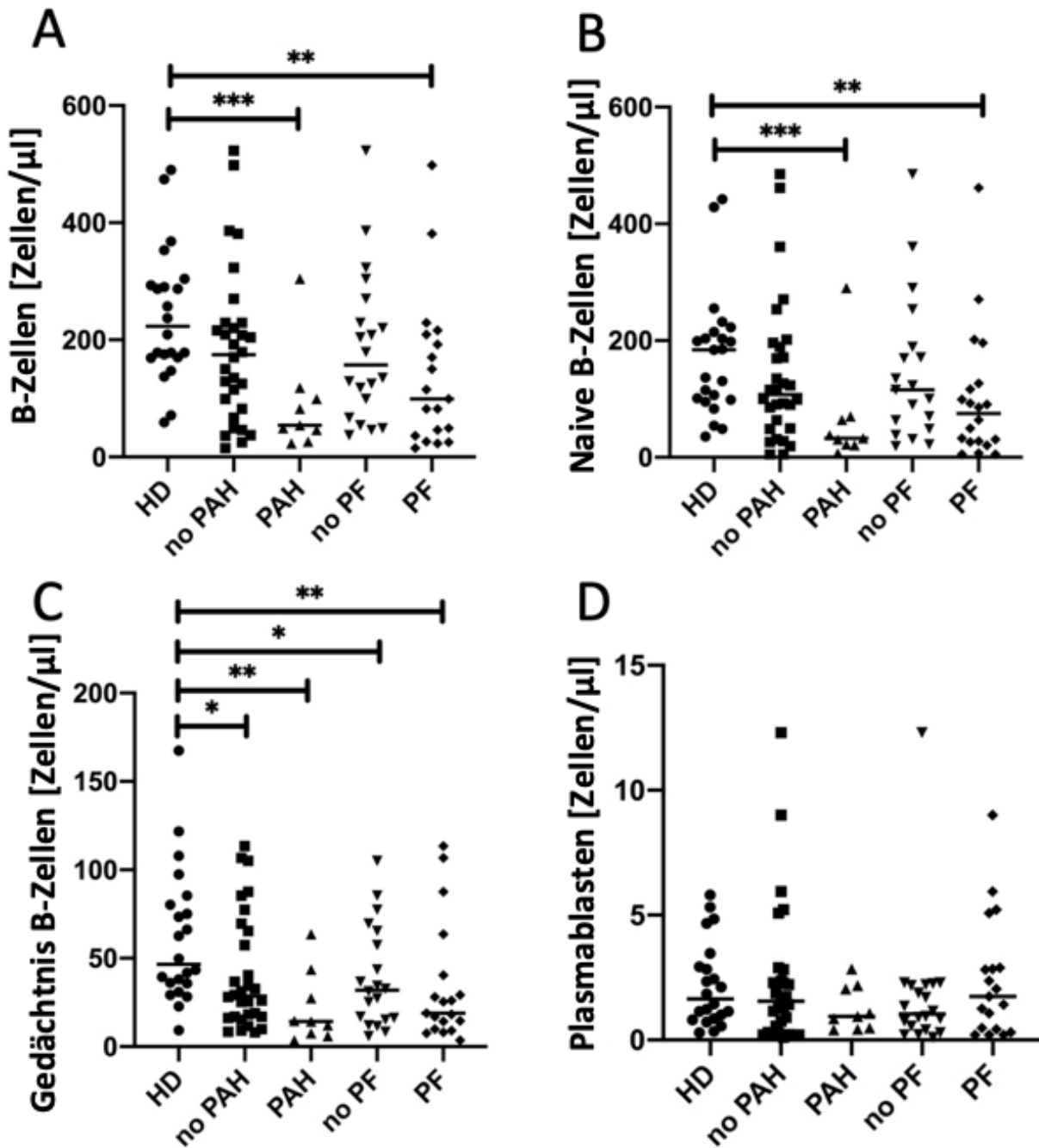


Abbildung 10 Vergleich der absoluten Anzahlen der B-Zellen insgesamt (**A**), CD20+CD27⁻ naiven B-Zellen (**B**), CD20+CD27⁺ Gedächtnis B-Zellen (**C**) und CD20⁻/geringCD27^{hoch} Plasmablasten (**D**) zwischen gesunden Probanden und den untersuchten SSc-Patienten, aufgeteilt nach dem Vorhandensein bzw. Nicht-Vorhandensein einer pulmonalen Hypertonie (PAH) und einer Lungenfibrose (PF).

Weitere Klinische Subanalysen zeigten, dass der zuvor beschriebene relative Anstieg IgA-positiver Plasmablasten höher in Patienten mit Lungenfibrose ist (gesunde

Probanden 48 ± 11 (Median/SD) vs. SSc-PF-Patienten $66,1 \pm 10,8$ (Median/SD), $d=1$ (Cohen's d), $p=0,0024$) (Abbildung 11).

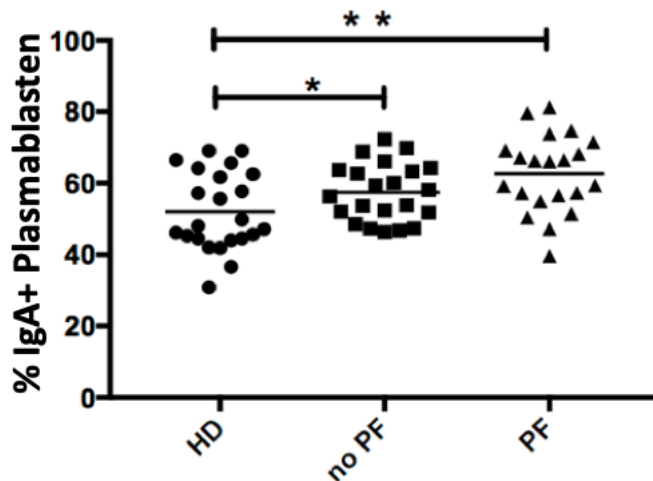


Abbildung 11 Vergleich der relativen Anteile von IgA-positiven Plasmablasten zwischen gesunden Probanden (Healthy Donors, HD), SSc-Patienten mit Lungenfibrose (pulmonary fibrosis, PF) und ohne Lungenfibrose (no PF).

Die erhöhte Aktivität des mukosalen Immunsystems, die der höhere relative Anteil $\alpha_4\beta_7$ -Integrin positiver Plasmablasten vermuten lässt, trat nur bei SSc-Patienten mit pulmonaler Beteiligung auf, hier definiert als pulmonale Hypertonie (PAH) oder Lungenfibrose (PF) (gesunde Probanden $35,2 \pm 17,2$ % (Median/SD) vs. SSc-PAH-Patienten $59,9 \pm 16,8$ % (Median/SD), $d=1,1$ (Cohen's d), $p=0,0066$), (gesunde Probanden $35,2 \pm 17,2$ % (Median/SD) vs. SSc-PF-Patienten $45,1 \pm 15,8$ % (Median/SD), $d=0,8$ (Cohen's d), $p=0,0088$) (Abbildung 12A). Die $\alpha_4\beta_7$ -Integrin Expressionsspiegel unterschieden sich zwischen gesunden Probanden und SSc-Patienten ohne pulmonale Beteiligung nicht signifikant (Abbildung 12A). Dasselbe Muster mukosaler Überaktivität bei Patienten mit pulmonaler Beteiligung ließ sich in den Expressionsunterschieden von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf IgA positiven Plasmablasten erkennen (gesunde Probanden $22,4 \pm 19,3$ % (Median/SD) vs. SSc-PAH-Patienten $56 \pm 19,6$ % (Median/SD), $d=1,1$ (Cohen's d), $p=0,0098$), (gesunde Probanden $22,4 \pm 19,3$ % (Median/SD) vs. SSc-PF-Patienten $43,7 \pm 18,1$ % (Median/SD), $d=0,8$ (Cohen's d), $p=0,0076$) (Abbildung 12B).

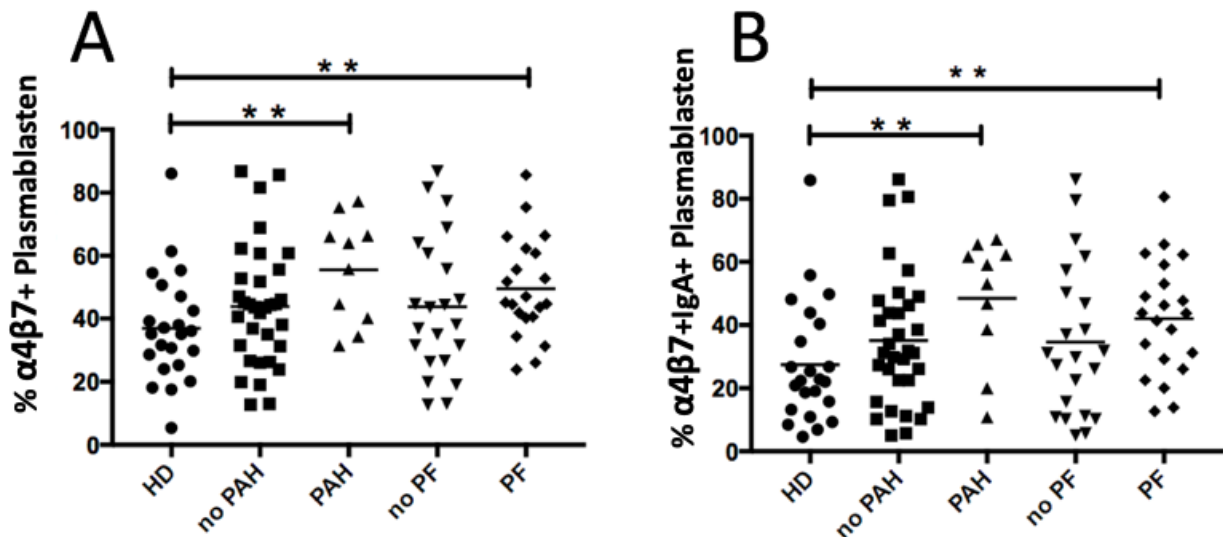


Abbildung 12 Subanalysen der relativen Anteile von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin positiven Plasmablasten an allen Plasmablasten von gesunden Probanden und Patienten mit SSc aufgeteilt in Patienten mit pulmonaler Hypertonie (PAH) und Lungenfibrose (pulmonary fibrosis, PF) **A**, Die generelle relative Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin war statistisch signifikant erhöht bei Patienten mit pulmonaler Beteiligung in der Form von pulmonaler Hypertonie oder Lungenfibrose **B**, Die relative Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf IgA-positiven Plasmablasten ist ebenfalls signifikant erhöht bei Patienten mit pulmonaler Beteiligung in der Form von pulmonaler Hypertonie oder Lungenfibrose.

4.6 Die nach B-Zell depletierender Therapie verbleibenden Plasmablasten/zellen von SSc-Patienten weisen einen mukosalen Phänotyp auf

Drei Patienten unserer Studie erhielten eine B-Zell depletierende Therapie mit Rituximab. Patienten mit SSc zeigten einen relativen Anstieg im Bezug auf alle Plasmablasten von Plasmablasten, die $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und IgA exprimieren (gesunde Probanden $22,4 \pm 19,3$ % (Median/SD) vs. SSc-Patienten $38,6 \pm 22,2$ % (Median/SD), $d=0,6$ (Cohen's d), $p=0,0149$). Dieser relative Anstieg von Zellen, die $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und IgA exprimieren ist bei Patienten nach B-Zell depletierender Therapie mit Rituximab auf den verbliebenen Plasmablasten signifikant erhöht (gesunde Probanden $22,4 \pm 19,3$ % (Median/SD) vs. SSc-Patienten mit RTX $65,5 \pm 19$ % (Median/SD), $d=2,1$ (Cohen's d), $p=0,0085$) (Abbildung 13).

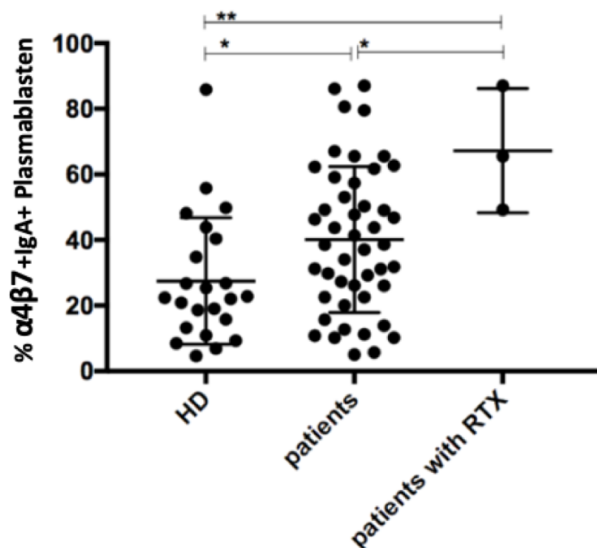


Abbildung 13 Erhöhte Frequenz von mukosalen IgA-positiven Plasmablasten nach B-Zell depletierender Therapie. Die relative Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin ist auf den verbliebenen IgA-positiven Plasmablasten von SSc-Patienten nach der Therapie mit Rituximab signifikant erhöht im Vergleich zu gesunden Probanden und SSc-Patienten ohne Therapie mit Rituximab im Krankheitsverlauf.

4.7 Unter den Patienten mit SSc haben vor allem die Patienten mit pulmonaler Beteiligung eine verringerte absolute Anzahl an T-Zellen

Im Rahmen der quantitativ vergleichenden Analyse der T-Zellen fiel eine generelle T-Lymphozytopenie der SSc-Patienten auf (gesunde Probanden $1309 \pm 407,4$ Zellen/ μ l (Median/SD) vs. SSc-Patienten $902 \pm 530,4$ Zellen/ μ l (Median/SD), $d=0,73$ (Cohen's d), $p=0,0015$), (gesunde Probanden $1309 \pm 407,4$ Zellen/ μ l (Median/SD) vs. ISSc-Patienten $815 \pm 447,6$ Zellen/ μ l (Median/SD), $d=0,94$ (Cohen's d), $p=0,0008$), (gesunde Probanden $1309 \pm 407,3$ Zellen/ μ l (Median/SD) vs. dSSc-Patienten $1072 \pm 628,1$ Zellen/ μ l (Median/SD), $d=0,548$ (Cohen's d), $p=0,0401$) (Abbildung 14). Damit einhergehend waren auch die Mengen CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten in den jeweiligen Patientenkohorten vermindert, vor allem bei Patienten mit ISSc (gesunde Probanden CD4+ T-Zellen $801,1 \pm 298,7$ Zellen/ μ l (Median/SD) vs. SSc-Patienten CD4+ T-Zellen $663 \pm 423,4$ Zellen/ μ l (Median/SD), $d=0,39$ (Cohen's d), $p=0,0268$), (gesunde Probanden CD4+ T-Zellen $801,1 \pm 298,7$ Zellen/ μ l (Median/SD) vs. ISSc-Patienten CD4+ T-Zellen $585,2 \pm 373,9$ Zellen/ μ l (Median/SD), $d=0,65$ (Cohen's d), $p=0,0058$), (gesunde Probanden CD4+ T-Zellen $801,1 \pm 298,7$ Zellen/ μ l (Median/SD) vs. dSSc-Patienten CD4+

T-Zellen $756,8 \pm 513,2$ Zellen/ μ l (Median/SD), $d=0,12$ (Cohen's d), $p=0,36$), (gesunde Probanden CD8+ T-Zellen $391 \pm 151,7$ Zellen/ μ l (Median/SD) vs. SSc-Patienten CD8+ T-Zellen $234,4 \pm 194,6$ Zellen/ μ l (Median/SD), $d=0,7$ (Cohen's d), $p=0,0011$), (gesunde Probanden CD8+ T-Zellen $391 \pm 151,7$ Zellen/ μ l (Median/SD) vs. ISSc-Patienten CD8+ T-Zellen $198,8 \pm 103,9$ Zellen/ μ l (Median/SD), $d=1,43$ (Cohen's d), $p<0,0001$), (gesunde Probanden CD8+ T-Zellen $391 \pm 151,7$ Zellen/ μ l (Median/SD) vs. dSSc-Patienten CD8+ T-Zellen $258,9 \pm 248,6$ Zellen/ μ l (Median/SD), $d=0,296$ (Cohen's d), $p=0,0765$) (Abbildung 19). Im Zuge der Betrachtung der klinischen Manifestationen der SSc konnten wir nachweisen, dass vor allem Patienten mit einer PAH, in geringerem Maße auch mit einer PF, verminderte absolute Mengen an T-Lymphozyten bzw. CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten aufweisen (gesunde Probanden T-Zellen $1309 \pm 407,4$ Zellen/ μ l (Median/SD) vs. SSc-PAH-Patienten T-Zellen $729 \pm 307,5$ Zellen/ μ l (Median/SD), $d=1,99$ (Cohen's d), $p=0,0002$), (gesunde Probanden T-Zellen $1309 \pm 407,4$ Zellen/ μ l (Median/SD) vs. SSc-PF-Patienten T-Zellen $869 \pm 637,1$ Zellen/ μ l (Median/SD), $d=0,58$ (Cohen's d), $p=0,014$), (gesunde Probanden CD4+ T-Zellen $801,1 \pm 298,7$ Zellen/ μ l (Median/SD) vs. SSc-PAH-Patienten CD4+ T-Zellen $379,9 \pm 293,8$ Zellen/ μ l (Median/SD), $d=1,47$ (Cohen's d), $p=0,0009$), (gesunde Probanden CD4+ T-Zellen $801,1 \pm 298,7$ Zellen/ μ l (Median/SD) vs. SSc-PF-Patienten CD4+ T-Zellen $627,6 \pm 527$ Zellen/ μ l (Median/SD), $d=0,33$ (Cohen's d), $p=0,0301$), (gesunde Probanden CD8+ T-Zellen $391 \pm 151,7$ Zellen/ μ l (Median/SD) vs. SSc-PAH-Patienten CD8+ T-Zellen $188,8 \pm 100$ Zellen/ μ l (Median/SD), $d=1,65$ (Cohen's d), $p=0,0008$), (gesunde Probanden CD8+ T-Zellen $391 \pm 151,7$ Zellen/ μ l (Median/SD) vs. SSc-PF-Patienten CD8+ T-Zellen $231,9 \pm 248,3$ Zellen/ μ l (Median/SD), $d=0,048$ (Cohen's d), $p=0,0144$) (Abbildung 14; 15).

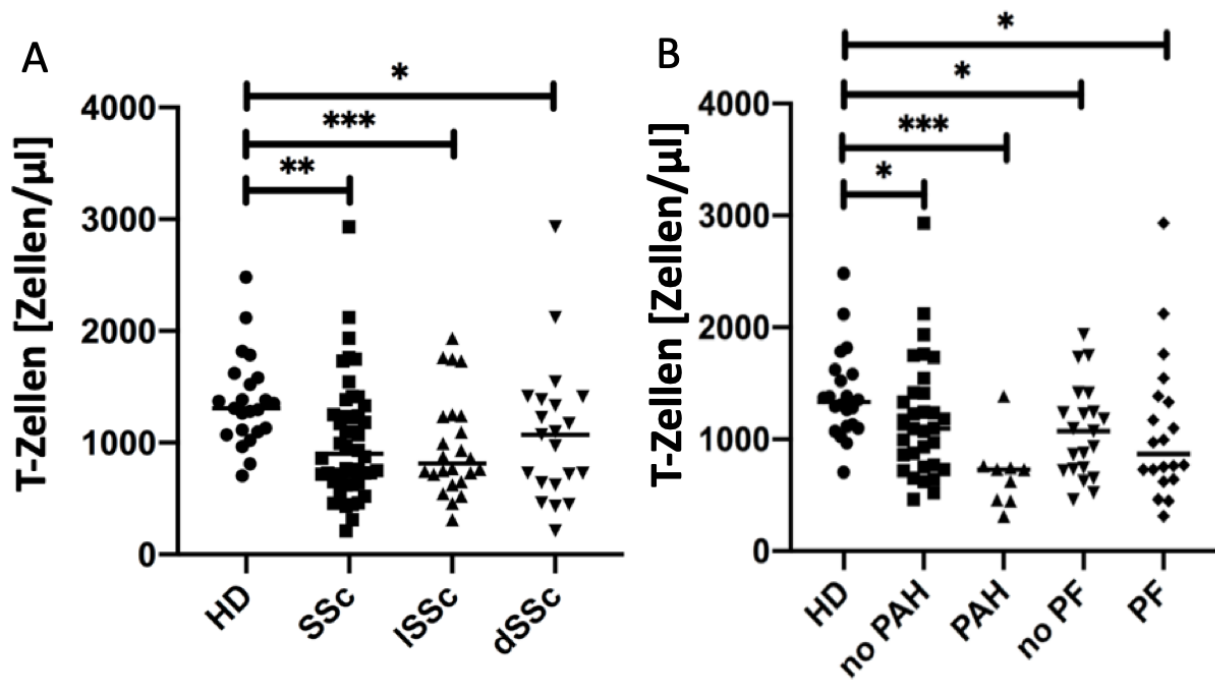


Abbildung 14 Absolute Mengen CD3+ T-Zellen im Vergleich gesunder Probanden mit SSc-Patienten bzw. deren Subformen (A) und den einzelnen pulmonalen Krankheitsmanifestationsgruppen (B). Alle untersuchten Patientengruppen wiesen signifikant weniger T-Lymphozyten auf als die gesunde Kontrollkohorte.

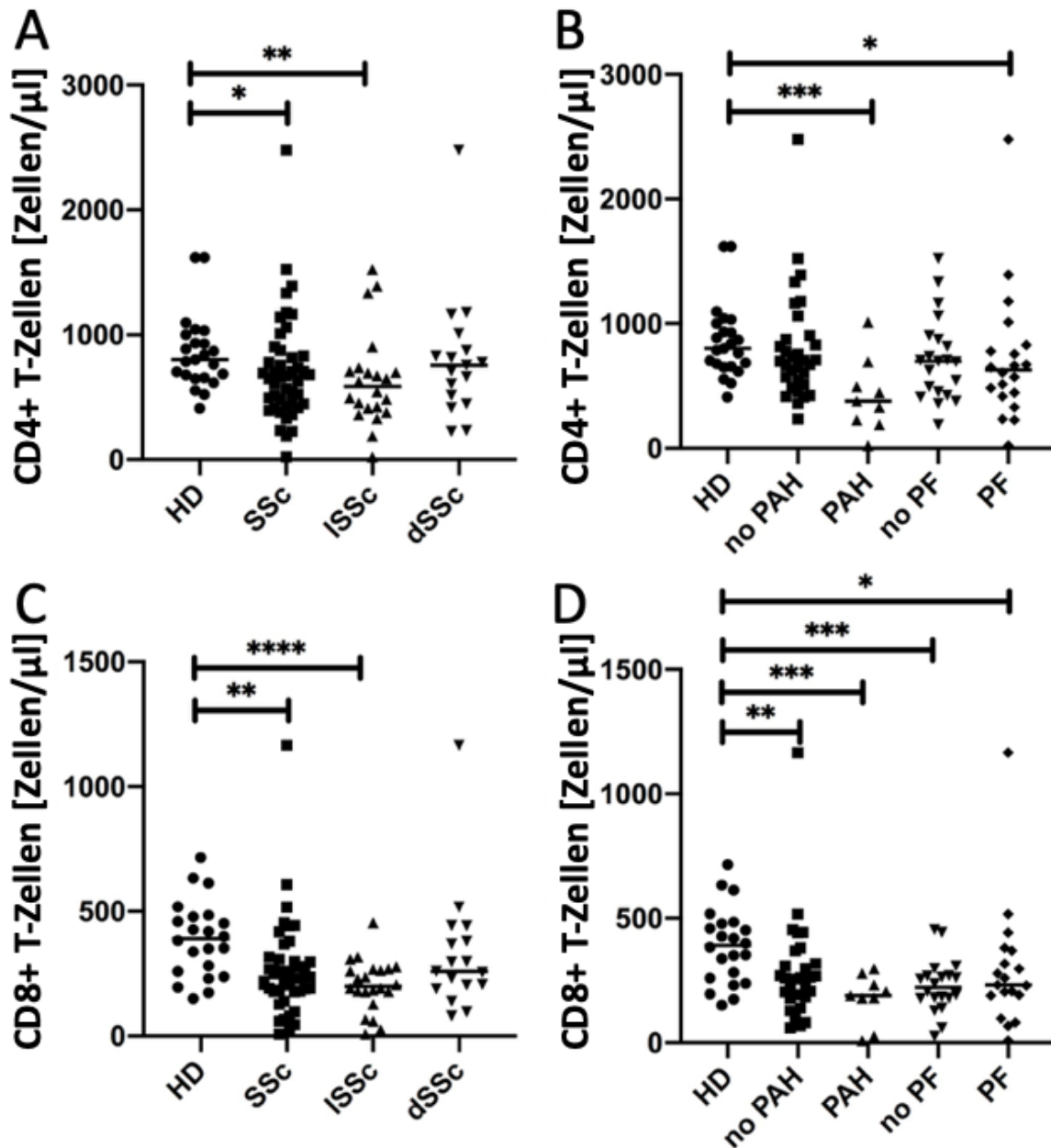


Abbildung 15 Absolute Mengen CD4+ (A,B) und CD8+ (C,D) positiver T-Zellen im Vergleich gesunder Probanden mit SSc-Patienten bzw. deren Subformen (A,C) und den einzelnen pulmonalen Krankheitsmanifestationsgruppen (B,D). Bis auf die Gruppe der dSSc-Patienten maßen wir in allen untersuchten Patientengruppen signifikant weniger CD4+ bzw. CD8+ T-Lymphozyten als in der gesunden Kontrollkohorte.

4.8 Im Vergleich von naiven- und Gedächtnis-T-Zellen zeigen sich keine quantitativen Veränderungen zwischen gesunden Probanden und SSc-Patienten

Des Weiteren untersuchten wir die naiven- und Gedächtnis-T-Zellen auf Unterschiede zwischen den einzelnen untersuchten Populationen.

Im durchgeführten statistischen Vergleich ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den von uns untersuchten SSc-Patienten und gesunden Probanden nachweisen (gesunde Probanden naive T-Zellen $45,2 \pm 16,27$ % (Median/SD) vs. SSc-Patienten naive T-Zellen $42,7 \pm 18,34$ % (Median/SD), $d=0,18$ (Cohen's d), $p=0,6895$), (gesunde Probanden Gedächtnis-T-Zellen $44,7 \pm 12,88$ % (Median/SD) vs. SSc-Patienten Gedächtnis-T-Zellen $50 \pm 17,77$ % (Median/SD), $d=0,064$ (Cohen's d), $p=0,8957$) (Abbildung 16).

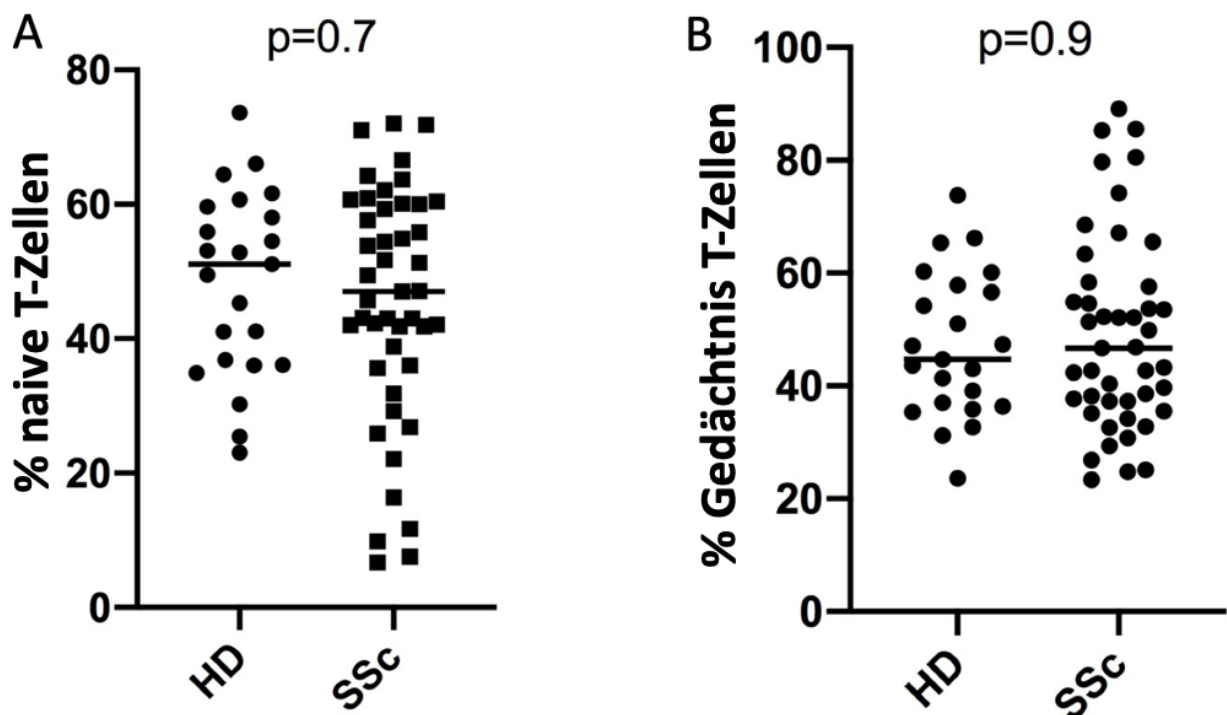


Abbildung 16 Relative Häufigkeiten naiver- (A) und Gedächtnis- (B) T-Zellen. In der Analyse beider Zellpopulationen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen gesunden Probanden und den SSc-Erkrankten insgesamt bzw. deren einzelnen Manifestationsgruppen

5 Diskussion

Erstmalig konnten wir in der vorliegenden Studie Hinweise für ein überaktiviertes mukosales Immunsystem bei SSc-Patienten gewinnen.

Es gelang uns pulmonale Krankheitsmanifestationen in Verbindung mit speziellen zellulären Veränderungen des peripheren Blutes zu setzen (*Tabelle 3*)

	Pulmonale Fibrose	Pulmonale Hypertonie
Zunahme ↑	<ul style="list-style-type: none"> - Frequenz IgA+ Plasmablasten - Frequenz $\alpha_4\beta_7$-Integrin+ Plasmablasten - Frequenz $\alpha_4\beta_7$-Integrin+IgA+ Plasmablasten -CD95 MFI -Siglec MFI auf Monozyten 	<ul style="list-style-type: none"> - Frequenz $\alpha_4\beta_7$-Integrin+ Plasmablasten - Frequenz $\alpha_4\beta_7$-Integrin+IgA+ Plasmablasten -Siglec MFI auf Monozyten
Abnahme ↓	<ul style="list-style-type: none"> - absolute Anzahl naiver und Gedächtnis B-Zellen - absolute Anzahl CD4+ und CD8+ T-Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> - absolute Anzahl naiver und Gedächtnis B-Zellen - absolute Anzahl CD4+ und CD8+ T-Zellen

Tabelle 3 Überblick der festgestellten Veränderungen im Rahmen der untersuchten Krankheitsmanifestationen.

Wir demonstrierten zum ersten Mal, dass ein Anstieg von Markern mukosaler Immunreaktionen auf peripheren Plasmablasten und -zellen von SSc-Patienten mit spezifischen Krankheitssymptomen korreliert. In Zukunft können diese Erkenntnisse eventuell als Biomarker zur Einschätzung bestimmter Organbeteiligungen wichtig werden. Zusätzlich könnten unsere Ergebnisse Angriffspunkte zielgerichteter Therapien darlegen und Beitrag zur generellen Entschlüsselung der Pathophysiologie der SSc liefern.

Grundlegende Arbeit bezüglich der B-Zell-Subpopulationen bei SSc wurde von Sato et al. erbracht. Diese Arbeit zeigte eine stabile B-Zell-Zahl im Vergleich zu Gesunden. Allerdings verändert sich in dieser Studie die Verteilung der B-Zellen auf die Subpopulationen (naive B-Zellen, Gedächtnis B-Zellen und Plasmablasten). Es kommt

zu einer Zunahme der absoluten Zahl naiver und Gedächtnis B-Zellen und gleichzeitig einer Abnahme der absoluten Anzahl von Plasmablasten (136). Unsere Ergebnisse hingegen zeigten eine gleichmäßige Abnahme aller erwähnten B-Zell-Subpopulationen und eine entsprechende B-Lymphozytopenie (Abbildung 7).

Bezüglich der Frequenzen der B-Zell-Subpopulationen sehen wir keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und gesunden Probanden. Dies steht erneut im Kontrast zu bereits beschriebenen Ergebnissen von Sato et al.. Möglicherweise wird dies durch unterschiedliche Patientenkohorten oder die eingesetzten Medikamente mitverursacht.

Andere bereits bekannte Aspekte des Immunphänotyps von Patienten mit SSc konnten hingegen reproduziert werden. So ist auch in unserer Kohorte, ebenso wie bei Sato et al., eine erhöhte CD95-Expression auf Gedächtnis B-Zellen von SSc-Patienten nachweisbar (136). In unserer Patienten-Kohorte konnten wir zudem erstmalig zeigen, dass dieses Phänomen bei Patienten mit einer Lungenfibrose besonders ausgeprägt ist. Damit einhergehend ist die absolute Anzahl von Gedächtnis B-Zellen unserer SSc-Patientin mit Lungenfibrose im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant verringert (Abbildung 10). Die CD95-Expression auf B-Zellen nimmt in Folge ihrer Aktivierung zu. Durch die Interaktion mit dem CD95-Liganden kommt es zur CD95-vermittelten Apoptose, worin ein essentieller Begrenzungsmechanismus der B-Zellen liegt (137). Basierend auf der erhöhten CD95-Expression der absolut verringerten Gedächtnis B-Zellen schlossen Sato et al. in ihrer Studie auf eine erhöhte Aktivierung der Gedächtnis B-Zellen bei SSc-Patienten (82). In Analogie dazu könnten unsere Ergebnisse Hinweise auf eine erhöhte Aktivität der Gedächtnis B-Zellen speziell bei Lungenfibrose bei SSc geben.

Im Gegensatz zu den Daten von Sato et al. sieht die Arbeitsgruppe von Lopez-Cacho Veränderungen im Immunphänotyp von Patienten mit SSc, die unseren Daten entsprechen (138). Vergleichbar zu dieser Arbeit sehen wir eine besonders ausgeprägte Abnahme der B-Zellen bei Patienten mit pulmonaler Beteiligung in Form einer Lungenfibrose oder pulmonalen Hypertonie.

Ergänzend sehen wir diese Abnahme allerdings auch bei naiven und Gedächtnis B-Zellen, sowie den Plasmablasten. Limitierend ist hier, bei unseren Daten genauso in der Arbeit von Lopez Cacho et al, dass ein Einfluss der medikamentösen Therapie auf die absolute Lymphozytenzahl und damit entsprechende Verschiebungen in den B-Zellen beachtet werden müssen. Gerade bei Patienten mit einer Lungenbeteiligung kann eine

schwerere Immunsuppression angenommen werden, als bei Patienten ohne eine Organbeteiligung. In unserer Patientenkohorte konnte sowohl für Patienten mit einer Cyclophosphamid-Behandlung wie auch für Patienten unter Glukokortikoiden eine deutliche Veränderung gezeigt werden (Abbildungen nicht gezeigt). Von den 12 Patienten mit einer pulmonalen Hypertonie erhielten 3 Cyclophosphamid und 7 Glukokortikoide (2 davon eine kombinierte Therapie aus Glukokortikoiden und Cyclophosphamid). Von den 21 Patienten mit einer Lungenfibrose erhielten 11 Cyclophosphamid und 9 Glukokortikoide (3 davon eine kombinierte Therapie aus Glukokortikoiden und Cyclophosphamid). Für beide Medikamente ist ein Einfluss auf die B-Zellen beschrieben (133).

Zentraler Aspekt der Krankheitsentstehung der SSc ist, dass bestimmte immunologische Störungen zu speziellen Veränderungen vor allem mukosaler Organe, wie der Lunge oder dem Gastrointestinaltrakt, führen.

Basierend auf der Annahme, dass eine mukosale Beteiligung ein sehr häufiges klinisches Symptom ist und damit dem mukosalen Immunsystem bei der SSc eine wichtige Rolle zukommt und zudem Autoantikörper ein wichtiges Phänomen bei der SSc sind, analysierten wir die Expression von Markern für eine mukosale Aktivierung auf Plasmablasten.

Interessanterweise fanden wir einen erhöhten Anteil IgA-sezernierender Plasmablasten in allen Plasmablasten bei Patienten mit SSc im Vergleich zu Gesunden. Entsprechend kann man hier von einem mukosalen Ursprung der Plasmablasten ausgehen (Abbildung 8). Diese Expansion der Population der IgA-positiven Plasmablasten war besonders ausgeprägt bei Patienten mit Lungenfibrose (Abbildung 11). Entsprechend kann man hier darüber spekulieren, dass gerade im Rahmen einer Lungenbeteiligung vermehrt Plasmablasten in der Mukosa ausreifen oder die B-Zellen dort aktiviert werden. IgA-sezernierende Plasmablasten differenzieren sich, wie in der Einleitung beschrieben, vor allem in mukosa-assoziiertem Lymphgewebe unter dem Einfluss von TGF- β (126). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass IgA-positive Plasmablasten ebenfalls zu einem geringen Teil im Rahmen systemischer Immunreaktionen generiert werden und somit nicht uneingeschränkt als Marker mukosaler Immunreaktionen betrachtet werden können (139).

Wie unter anderem die Gruppe von Henrik Mei zeigen konnte und in der Einleitung dargelegt ist, weißt die Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf Plasmablasten auf ihre Entstehung im Rahmen einer mukosalen Immunreaktion hin.

Wir zeigen hier erstmalig, dass auch bei der Systemischen Sklerose das mukosale Immunsystem überaktiviert ist. SSc Patienten wiesen eine deutlich erhöhte Frequenz IgA-positiver und $\alpha_4\beta_7$ -Integrin-positiver CD19⁺/CD20⁻/CD27⁺⁺ Plasmablasten an allen Plasmablasten auf (Abbildung 8 und 9). Interessanterweise war auch dieser Anstieg besonders ausgeprägt bei SSc-Patienten mit pulmonaler Beteiligung in der Form von Lungenfibrose oder PAH (Abbildung 12). Da es sich auch bei der Lunge um ein mukosales Organ handelt, lässt sich hierin ein Hinweis auf ein überaktiviertes mukosales Immunsystem erkennen.

Mei et al. proklamierten 2010, dass Plasmablasten, die aus mukosalen Immunreaktionen entstanden sind, eine erhöhte Widerstandskraft gegenüber B-Zell-depletierenden Therapien, beispielsweise mit Rituximab, aufweisen (139). Diese mukosalen Plasmablasten exprimierten IgA, CCR10 und $\alpha_4\beta_7$ -Integrin. Interessanterweise war die generelle Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf Plasmablasten von RA Patienten vor der B-Zell depletierenden Therapie mit Rituximab geringer als auf Plasmablasten bei gesunden Probanden. $\alpha_4\beta_7$ -Integrin war hingegen, wie beschrieben, auf den Plasmablasten der von uns untersuchten SSc-Patienten bereits vor der B Zell-depletierenden Therapie in höherer Frequenz exprimiert. Im Rahmen der Rheumatoiden Arthritis kann es zwar zu einer interstitiellen Lungenerkrankung kommen, intestinale Beteiligungen sind jedoch nicht beschrieben (140). Ein möglicher Zusammenhang zwischen der verringerten $\alpha_4\beta_7$ -Integrin Expression der Plasmablasten bei RA und der fehlenden Darmbeteiligung ist denkbar.

Nichtsdestotrotz sind jedoch, wie bei der SSc auch, gewisse quantitative Veränderungen des intestinalen Mikrobioms mit der RA assoziiert sind. Wie bei der SSc kommt es auch bei der RA zu einem intestinalen Anstieg von *Prevotella* spp. Andere bei der SSc intestinal vermehrt auftretende Bakteriengattungen wie *Bacteroides* oder *Bifidobacterium* sind im Darm von RA Patienten vermindert beschrieben worden (141,142). Die Rolle von *Porphyromonas gingivalis* als potenzieller Trigger der RA Pathogenese durch eine Induktion der Produktion citrullinierter Antigene ist inzwischen gut bekannt (143).

Auch in der Kohorte unserer SSc-Patienten fanden wir nach der RTX-Therapie bei den verbliebenden Plasmablasten eine erhöhte Frequenz $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und IgA-positiver Plasmablasten (Abbildung 13). Eine wichtige Limitation dabei ist jedoch, dass in unserer Studie lediglich drei Patienten nach Rituximab-Therapie analysiert wurden. Nichtsdestotrotz ähnelt der mukosale Phänotyp der verbliebenen Plasmablasten nach RTX-Therapie den von Mei et al. bei der Rheumatoiden Arthritis beschriebenen Plasmablasten nach RTX-Therapie (139). Solche Zellen könnten gemäß Mei et al. eine autarke B-Zellpopulation in mukosalen Geweben darstellen, die sich gewissermaßen dem Einfluss einer B-Zell depletierenden Therapie mit Rituximab entzieht.

Basierend auf den in der Einleitung beschriebenen Erkenntnissen der Rolle von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und IgA als Marker mukosaler Immunreaktionen ließe sich somit schließen, dass die verbliebenen B-Zellen nach B-Zell depletierender Therapie vor allem aus mukosalen Immunreaktionen stammen.

Lemke et al. konnten zeigen, dass in mukosalen Geweben generierte Plasmablasten die Fähigkeit besitzen, sich zu langlebigen Plasmazellen im Knochenmark zu entwickeln (144). Solche Erkenntnisse sprechen gegen eine strikte Kompartimentierung des Immunsystems in mukosal vs. systemisch. In mukosalen Immunreaktionen generierte Plasmablasten tragen unter gewissen Umständen zu den systemischen langlebigen Plasmazellen im Knochenmark bei. Die daraus resultierenden Konsequenzen gelten jedoch sowohl für protektive als auch für pathologische mukosale Immunreaktionen (144).

Ähnlich wie unsere Daten zeigt eine weitere Arbeit von Mei et al. aus dem Jahr 2017 bei Patienten mit systemischem Lupus Erythematoses (SLE) ebenfalls eine Überaktivierung des mukosalen Immunsystems. In dieser Arbeit wurde im Wesentlichen die Expression von IgA, CCR10 und $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf Plasmablasten untersucht. Während $\alpha_4\beta_7$ -Integrin für die starke Verbindung zwischen von IgA-Plasmablasten und dem Endothel von Blutgefäßen im Darm zuständig ist und entsprechend von Plasmablasten in der Lamina propria exprimiert wird, vermittelt die Expression von CCR10 von IgA⁺ Plasmablasten ihre Migration in Richtung von CCL28, einem Chemokinliganden, der im Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe genauso wie im lymphatischen Gewebe der Atemwege exprimiert wird (1).

Im Gegensatz zur SSc geht der SLE im Allgemeinen mit einer Plasmazytose einher (145). Durchflusszytometrieuntersuchungen zeigten, dass die untersuchten SLE Patienten absolut mehr IgA+ und CCR10+ (jeweils single positiv, aber auch IgA und CCR10 negative) Plasmablasten aufweisen als gesunde Probanden. Ein Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität und der Frequenz oder Anzahl IgA bzw. CCR10 positiver Zellen konnte allerdings nicht gezeigt werden.

Während die Frequenz der CCR10 positiven Plasmablasten bei den Patienten vergleichbar zu den gesunden Kontrollen war, war die Frequenz der $\alpha_4\beta_7$ -Integrin+ Plasmablasten reduziert im Vergleich zu Gesunden.

Entsprechend schlussfolgern die Autoren, dass sowohl CCR10 positive als auch negative, genauso wie $\alpha_4\beta_7$ -Integrin negative Plasmazellen zur Plasmazytose bei SLE beitragen. Einzig für einen Teil der Patienten mit aktivem SLE konnte auch eine Expansion der $\alpha_4\beta_7$ -Integrin positiven Plasmazellen (single positiv) im peripheren Blut gezeigt werden.

CCR10 und $\alpha_4\beta_7$ -Integrin wurden hier sowohl von IgA+ als auch von IgA negativen Plasmablasten exprimiert. Klare Koexpressionsmuster der beschriebenen mukosalen Marker ließen sich nicht erkennen, es konnte lediglich ein nicht signifikanter Trend einer verringerten Frequenz von IgA+CCR10+ $\alpha_4\beta_7$ -Integrin+ Plasmablasten bei SLE beschrieben werden.

Zusammengefasst liefert diese Studie Hinweise dafür, dass auch ein substanzialer Anteil der zirkulierenden IgA-negativen Plasmablasten einen mukosalen Phänotyp exprimiert. In der entsprechenden Studie exprimierten 75% der Plasmablasten beim Lupus mindestens IgA oder einen der mukosalen Homing-Rezeptoren. Auch von den Plasmablasten insgesamt zeigten 58% einen mukosalen Phänotyp, allerdings vergleichbar zu Gesunden. Entsprechend ziehen die Autoren die Schlussfolgerung, dass die Plasmazelleexpansion beim Lupus das Ergebnis einer systemischen Immunreaktion ist, die sowohl in der Mukosa als auch außerhalb dieser stattfindet (129).

Entsprechend können wir bei der SSc sowohl eine absolute als auch eine relative Erhöhung der IgA+ Plasmablasten im Vergleich zu gesunden Probanden beobachten wie auch eine Expansion der IgA+ $\alpha_4\beta_7$ -Integrin+ doppel-positiven Plasmablasten. Somit kann hier von einem stärkeren Einfluss mukosaler Immunreaktionen an der Gesamt-Plasmazellzahl als beim SLE ausgegangen werden. Dies passt zur häufigen sowohl gastrointestinalen als auch pulmonalen Beteiligung bei der SSc und lässt über eine pathogenetisch wichtige Rolle der mukosalen Plasmazellen spekulieren. Im Vergleich zu

den IgA+ $\alpha_4\beta_7$ -Integrin+ doppel-positiven Zellen waren die CCR10 positiven Zellen nicht signifikant verändert. Ein Trend war nicht zu erkennen (Abbildung 9). Auch in der Arbeit von Mei et al. aus dem Jahr 2017 war die Frequenz der CCR10 positiven Plasmablasten beim SLE nicht signifikant verändert. Im Rahmen der Plasmozytose des SLE waren die CCR10 positiven Plasmablasten jedoch auf absoluter Ebene vermehrt.

2015 konnten Chen et al. eine Überexpression von CCR10 in synovialen Geweben bei der Rheumatoiden Arthritis demonstrieren (146). 2018 wiesen Habieli et al. eine Überexpression von CCR10 auf pulmonalen Epithelzellen von Patienten mit idiopathischer pulmonaler Fibrose im Vergleich zu gesunden Probanden nach (147).

Eine Reihe von Serumzytokinen korrelierte in der Studie von Mei et al. aus dem Jahr 2017 mit dem Vorhandensein mukosaler Plasmablasten (CCR10+ und/oder IgA+) von SLE Patienten (129). Bei diesen Serumzytokinen handelte es sich zusammenfassend im Großteil um Zytokine, die entweder direkt oder über T-Zellen Einfluss auf die Qualität und Quantität der Plasmablasten ausüben (129). Zumal sich die Daten bei der SSc, die wir in dieser Studie zeigen konnten, etwas von den Daten beim SLE unterscheiden, wäre es hier spannend, nach den Spiegeln der entsprechenden Zytokine bei dieser Erkrankung zu schauen und auch mit dem SLE zu vergleichen.

Dies würde ein tieferes Verständnis der zugrunde liegenden immunologischen Prozesse ermöglichen.

Im klinischen Umgang mit der SSc ist man regelhaft mit der Aufgabe konfrontiert, den Zeitpunkt einer Krankheitsprogression bzw. einer neuen Organbeteiligung und vor allem einer Lungenbeteiligung früh zu entdecken. Entsprechend ist es schwierig, den richtigen Moment für eine Therapiemodifikation bzw. Therapieeskalation zu erkennen. Das Problem der meisten diagnostischen Verfahren ist dabei, dass eingetretene Veränderungen bereits eine manifeste Progression konstatieren und die damit verbundenen Organschäden teils irreversibel sind. Aus diesem Dilemma heraus ergibt sich der Bedarf an Biomarkern, mit denen sich frühzeitig eine Krankheitsprogression erkennen oder sogar vorhersagen lässt.

Trotz großer Fortschritte sowohl der traditionellen als auch der next-generation basierten Biomarker, gibt es weiterhin eine Erfordernis neuer Biomarker-Entwicklungen (148,149). Angesichts der klinischen Relevanz ist die Vorhersage der pulmonalen Progression der Erkrankung dabei momentan ein Feld intensiver Forschung.

Eine kürzlich veröffentlichte Übersichtsarbeit bietet einen Überblick über verschiedene zirkulierende Proteinbiomarker, die mit einer PAH bei SSc-Patienten assoziiert sind. Diese sind im Wesentlichen mit den an der Pathogenese der PAH assoziierten TGF- β und Vascular endothelial growth factor (VEGF) Signalwegen assoziiert. Keiner dieser Biomarker war IgA oder mit mukosalen Immunreaktionen assoziiert (150). Ein etablierter Proteinbiomarker der PAH ist das N-terminale pro Brain natriuretic peptide (NT-proBNP), welcher als einziger Eingang in die 2015 ESC/ERS Leitlinien der Diagnose und Therapie der PAH gefunden haben (135). Eine NT-proBNP Erhöhung ist jedoch weder spezifisch für die PAH als solche noch für die PAH bei SSc. Bei der SSc kann NT-proBNP ebenfalls im Rahmen einer myokardialen Beteiligung erhöht sein (150). 2017 konnten Chung et al. demonstrieren, dass bei einem NT-proBNP Grenzwert von ≥ 210 pg/mL eine SSc-assoziierte PAH mit einer Sensivität von 73% und einer Spezifität von 78% detektiert werden kann (151).

Klinisch wurden 2018 eine Abnahme der SpO₂ im Rahmen des 6 Minuten Gehtests und eine jemals aufgetretene Arthritis als unabhängige Prädiktoren einer Lungenfibrose bei SSc-Patienten identifiziert (152).

Andere neuere Studien, die erst nach dem Abschluss unserer Datensammlung erschienen, konnten zum Beispiel den prognostischen Wert von CXCR3- und CXCR4-Antikörpern (IgG) und Serum-Interleukin-35 Spiegeln für die Vorhersage einer SSc assoziierten Lungenfibrose zeigen (153,154). Allerdings wurde hier ausschliesslich nach IgG geschaut. Über IgA finden sich keine Angaben. Die CXCR3 und CXCR4 Antikörperspiegel korrelierten bei Patienten mit SSc assoziierter Lungenfibrose negativ mit den erhobenen Parametern der Lungenfunktion (vor allem mit der Vitalkapazität und der Diffusionskapazität). Interessanterweise waren jedoch gerade die Patienten mit vergleichsweise geringen CXCR3 und CXCR4 Antikörperspiegeln von einer zunehmenden Verschlechterung der Lungenfunktion betroffen. Inmitten der Vielzahl der mit der SSc assoziierten Autoantikörper sind solche Erkenntnisse mit potenziell prognostischem Wert entscheidend, um den Krankheitsverlauf interindividuell besser einschätzen zu können.

Da es sich bei unserer Studie um eine Immunphänotypische Analyse zu nur einem Zeitpunkt pro Patienten handelt und wir den klinischen Verlauf der Patienten hier nicht longitudinal weiterverfolgt haben, können wir nicht abschätzen, ob die Frequenz der IgA-Plasmablasten auch prognostisch relevant ist.

In einem nächsten Schritt wäre es hier sicher interessant, bei Patienten ohne bekannte Lungenbeteiligung longitudinal die Population der mukosalen Plasmablasten zu verfolgen. Mit den vorhandenen Daten können wir allerdings erstmalig zeigen, dass eine Korrelation zwischen einer Expansion IgA-positiver Plasmablasten und anderer Plasmablasten mit einem mukosalen Phänotyp und einer Lungenbeteiligung besteht und über eine entsprechende pathogenetische Rolle der Zellen spekulieren.

Unsere Analyse der Frequenz der naiven und Gedächtnis T-Zellen erbrachte keine signifikanten Veränderungen zwischen gesunden Probanden und SSc-Patienten (Abbildung 16). Diese Erkenntnis muss ggf im Kontext der generellen Abnahme naiver T-Zellen im Alter betrachtet werden. Giovanetti et al. postulierten 2010, dass es bei SSc-Patienten im Alter von 22 bis 80 (Durchschnittsalter 56 ± 14) über die Lebensspanne evtl. zu einer Expansion CD4+ naiver T-Zellen kommen könnte (155). Angesichts der großen Spannweite der relativen Mengen CD4+naiver T-Zellen unserer SSc-Patienten und deren im Durchschnitt höherem Alter ($59 \pm 12,8$), können wir diese These in dieser Studie nicht widerlegen. Teilt man unsere Patientenkohorte anhand ihres Alters in 2 Gruppen ein, die Patienten unter und die Patienten über 50 Jahre, so bestätigt sich jedoch auch in unserer Studie dieser Eindruck. Die durchschnittliche Menge CD4+ naiver T-Zellen der Patienten unter 50 Jahren lag bei $607,3/\mu\text{l}$ ($\pm 207,2$) und der über 50-jährigen Patienten entsprechend bei $784,7/\mu\text{l}$ ($\pm 481,1$).

Die Analyse der Population der regulatorischen T-Zellen zeigte in unserer Kohorte keine signifikanten Unterschiede zwischen gesunden Probanden und SSc-Patienten (Daten nicht abgebildet). Wie in der Einleitung erläutert, gibt es bezüglich der quantitativen Veränderungen der regulatorischen T-Zellen sehr unterschiedliche Daten. Slobodin et al. liefern in ihrer diesbezüglichen Übersichtsarbeit Beispiele von Studien die erhöhte, unveränderte oder verringerte Mengen regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut von SSc-Patienten gemessen haben. Bezüglich der Patientenkohorten fallen dabei keine wesentlichen Unterschiede auf (117).

Limitationen

Unsere Studie weist einige Limitationen auf.

Die untersuchte Patientenpopulation war klinisch sehr heterogen. Die Therapien sowie die klinischen Verläufe waren sehr unterschiedlich. Insbesondere bei Patienten, die Cyclophosphamid erhalten haben, ist von einem größeren Einfluss auf die Lymphozyten auszugehen als bei anderen Therapien. Auch die kumulative Dosis, die sehr variierte, hat hier sicher einen Einfluss. Auf Grund der Kohortengröße lassen sich diese Einflussfaktoren in dieser Pilotstudie nicht völlig eliminieren. In den durchgeführten statistischen Analysen konnte allerdings kein Einfluss bestimmter Therapeutika auf die mukosalen Immunzellpopulationen (Daten nicht abgebildet) gezeigt werden.

Entsprechend sollten weiterführende Studien aus unserer Sicht vor allem vier Punkte adressieren:

- 1) Haben die IgA-Plasmablasten bzw die Plasmablasten mit mukosalem Phänotyp einen prognostischen Wert bei der SSc für die Vorhersage einer Lungenbeteiligung? Hierzu wäre eine longitudinale Analyse bei Patienten ohne bestehende Lungenbeteiligung nötig.
- 2) Besteht eine Korrelation der IgA-Plasmazellen mit einer gastrointestinalen Beteiligung bzw lässt sich diese Vorhersagen? Da sich die gastrointestinale Beteiligung jenseits der Ösophagusbeteiligung nur schwer erfassen lässt, müsste hier über ein besseres Read out nachgedacht werden.
- 3) Spielen die mukosalen Plasmablasten eine pathogenetische Rolle? Hierzu wären mechanistische Studien gegebenfalls auch im Tiermodell nötig sowie Analysen aus Biopsien der Lamina propria und dem Bronchialsystem. Dies war im Rahmen dieser Studie leider nicht möglich.
- 4) Besteht ein Zusammenhang zwischen Veränderungen des Darm- oder Lungenmikrobioms und der Expansion mukosaler Plasmazellen bei der SSc? Diese Analysen werden derzeit in einer weiterführenden Studie der Arbeitsgruppe analysiert.

Wenn es uns gelingen sollte, mukosale Plasmablasten, die in einem kausalen Zusammenhang der SSc-Pathogenese stehen, zu identifizieren, wären diese möglicherweise zudem ein gutes Therapieziel für neue therapeutische Ansätze.

Zusammenfassend leistet unsere Arbeit einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis der Rolle des mukosalen Immunsystems für die Pathophysiologie der SSc mit dem Ziel der Verbesserung zukünftiger diagnostischer und therapeutischer Optionen.

6 Literaturverzeichnis

1. Mei HE, Yoshida T, Sime W, Hiepe F, Thiele K, Manz RA, Radbruch A, Dörner T. Blood-borne human plasma cells in steady state are derived from mucosal immune responses. *Blood*. American Society of Hematology; 2009 Mar 12;113(11):2461–9.
2. Chiffлот H, Fautrel B, Sordet C, Chatelus E, Sibilia J. Incidence and Prevalence of Systemic Sclerosis: A Systematic Literature Review. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2008 Feb;37(4):223–35.
3. Valesini G, Litta A, Bonavita MS, Luan FL, Purpura M, Mariani M, Baisano F. Geographical clustering of scleroderma in a rural area in the province of Rome. *clinical and experimental rheumatology*. 1993 Jan;11(1):41–7.
4. Meyer A, Chiffлот H, Chatelus E, Kleinmann J-F, Ronde-Ousteau C, Klein D, Jégu J, Geny B, Hirshi S, Canuet M, Blasion G, Kleffer P, Lipsker D, Martin T, Sauleau E, Velten M, Sibilia J.. Brief Report: Spatial Heterogeneity of Systemic Sclerosis in France: High Prevalence in the Northeast Region. *Arthritis & Rheumatology*. John Wiley & Sons, Ltd; 2016 Jun 24;68(7):1731–7.
5. Laing TJ, Gillespie BW, Toth MB, Mayes MD, Gallavan RH, Burns CJ, Johanns JR, Cooper BC, Keroack BJ, Wasko MC, Lacey JV, Schottenfeld D. Racial differences in scleroderma among women in Michigan. *Arthritis & Rheumatism*. 1997 Apr;40(4):734–42.
6. Mayes MD, Lacey JV, Beebe-Dimmer J, Gillespie BW, Cooper B, Laing TJ, Schottenfeld D. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis & Rheumatism*. 2003 Aug;48(8):2246–55.
7. Roberts-Thomson PJ, Walker JG, Lu TY-T, Esterman A, Hakendorf P, Smith MD, Ahern MJ. Scleroderma in South Australia: further epidemiological observations supporting a stochastic explanation. *Internal Medicine Journal*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111); 2006 Aug;36(8):489–97.
8. Freire M, Rivera A, Sopena B, Viella C, Guillen-Del Castillo A, Arguelles D, Rubio J, Rivas M, Martinez L, Parra J, Carballeira M, Arandia N, Hernandez F, Arberas M, Comet L, Hitos J, Biacno J, Balive A, Salas X, Vuelta A, Munoz M, Pla V, Aznar C. Clinical and epidemiological differences between men and women with systemic sclerosis: a study in a Spanish systemic sclerosis cohort and literature review. *clinical and experimental rheumatology*. 2017 Oct 9;:1–9.
9. McCormic ZD, Khuder SS, Aryal BK, Ames AL, Khuder SA. Occupational silica exposure as a risk factor for scleroderma: a meta-analysis. *Int Arch Occup Environ Health*. Springer-Verlag; 2010 Jan 3;83(7):763–9.

10. Elhai M, Meune C, Avouac J, Kahan A, Allanore Y. Trends in mortality in patients with systemic sclerosis over 40 years: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Rheumatology*. 2012 May 17;51(6):1017–26.
11. LeRoy EC, Krieg T, Black C, Medsger T, Fleishmajer R, Rowell N, Jabblonska S, Wollheim F. Scleroderma (Systemic Sclerosis): Classification, Subsets and Pathogenesis. *J Rheumatol*. 1988 Mar 31;:1–5.
12. Van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, Martucci-Cerinic M, Naden RP, Medsger Jr T, Carreira PE, Riemekasten G, Clements P, Denton C, Distler O, Allanore Y, Fürst D, Gabrielli A, Mayes M, Van Laar JM, Seibold JR, Czirjak L, Steen VD, Inanc M, Kowal-Bielecka O, Müller-Ladner U, Valentini G, Veale DJ, Vonk MC, Walker UA, Chung L, Collier DH, Csuka ME, Fessler BJ, Guiducci S, Herrick A, Hsu VM, Jimenez S, Kahaleh B, Merkel PA, Sierakowski S, Silver RM, Simms RM, Varga J, Pope JE. 2013 Classification Criteria for Systemic Sclerosis: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative. *Arthritis & Rheumatism*. 2013 Oct 3;65(11):2737–47.
13. Jordan S, Distler J, Maurer B, Huscher D, van Laar J, Allanore Y, Distler O. Effects and safety of rituximab in systemic sclerosis: an analysis from the European Scleroderma Trial and Research (EUSTAR) group. *Ann Rheum Dis*. 2015 May 5;:1–8.
14. Saez-Comet L, Simeón-Aznar CP, Pérez Conesa M. Applying the ACR/EULAR Systemic Sclerosis Classification Criteria to the Spanish Scleroderma Registry Cohort . *J Rheumatol*. 2015 Nov 3;:1–6.
15. Bellando-Randone S, Guiducci S, Matucci-Cerinic M. Very early diagnosis of systemic sclerosis. *Pol Arch Med Wewn*. 2012 Dec 4;:1–6.
16. Guiducci S, Bellando-Randone S, Matucci-Cerinic M. A New Way of Thinking about Systemic Sclerosis: The Opportunity for a Very Early Diagnosis. *Isr Med Assoc J*. 2016 Mar;18(3-4):141–3.
17. van den Hombergh WMT, Carreira PE, Knaapen-Hans HKA, van den Hoogen FHJ, Fransen J, Vonk MC. An easy prediction rule for diffuse cutaneous systemic sclerosis using only the timing and type of first symptoms and auto-antibodies: derivation and validation. *Rheumatology*. 2016 Oct 24;55(11):2023–32.
18. Proudman SM, Stevens WM, Sahhar J, Celermajer D. Pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: the need for early detection and treatment. *Internal Medicine Journal*. Wiley/Blackwell (10.1111); 2007 Jun 4;37(7):485–94.
19. Cavagna L, Codullo V, Ghio S, Scirè CA, Guzzafame E, Scelsi L, Rossi S, Montecucco C, Caporali R. Undiagnosed connective tissue diseases. *Medicine*. 2016 Sep;95(39):e4827–5.
20. Walker UA, Tyndall A, Czirjak 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 Jan 12;66(6):754–63.

21. Koenig M, Joyal F, Fritzler MJ, Roussin A, Abrahamowicz M, Boire G, Goulet JR, Rich E, Grodzicky T, Raymon Y, Senécal JL. Autoantibodies and microvascular damage are independent predictive factors for the progression of Raynaud's phenomenon to systemic sclerosis: A twenty-year prospective study of 586 patients, with validation of proposed criteria for early systemic sclerosis. *Arthritis & Rheumatism.* 2008 Dec;58(12):3902–12.
22. Bellando-Randone S, Matucci-Cerinic M. From Raynaud's Phenomenon to Very Early Diagnosis of Systemic Sclerosis- The VEDOSS approach. *Curr Rheumatol Rev.* 2013;9(4):245–8.
23. Bellando-Randone S, Matucci-Cerinic M. Very Early Systemic Sclerosis and Pre-systemic Sclerosis: Definition, Recognition, Clinical Relevance and Future Directions. *curr rheumatolog rep. Current Rheumatology Reports;* 2017 Sep 23;:1–6.
24. Hanitsch LG, Burmester G-R, Witt C, Hunzelmann N, Genth E, Krieg T, Lehmacher W, Melchers I, Meurer M, Müller-Ladner U, Schulze-Lohoff E, Becker M, Sunderkoetter C, Riemekasten G. Skin sclerosis is only of limited value to identify SSc patients with severe manifestations--an analysis of a distinct patient subgroup of the German Systemic Sclerosis Network (DNSS) Register. *Rheumatology.* 2008 Nov 23;48(1):70–3.
25. Domsic RT, Rodriguez-Reyna T, Lucas M, Fertig N, Medsger TA. Skin thickness progression rate: a predictor of mortality and early internal organ involvement in diffuse scleroderma. *Ann Rheum Dis.* 2010 Dec 15;70(1):104–9.
26. Shand L, Lunt M, Nihtyanova S, Hoseini M, Silman A, Black CM, Denton CP. Relationship between change in skin score and disease outcome in diffuse cutaneous systemic sclerosis: Application of a latent linear trajectory model. *Arthritis & Rheumatism.* John Wiley & Sons, Ltd; 2007;56(7):2422–31.
27. Sehriban D, Dostrovsky N, Hudson M, Tatibouet S, Fritzler M, Baron M. Systemic Sclerosis Sine Scleroderma: A Multicenter Study of 1417 Subjects . *J Rheumatol.* 2014 Sep 29;:1–8.
28. Pearson DR, Werth VP, Pappas-Taffer L. Systemic sclerosis: Current concepts of skin and systemic manifestations. *Clinics in Dermatology.* 2018 Aug;36(4):459–74.
29. Bartoli F, Fiori G, Braschi F, Amanzi L, Bruni C, Blagojevic J, Bellando-Randone S, Cometi L, De Souza Mueller C, Guiducci S, Rasero L, Epifani F, Furst DE, Matucci-Cerinic M. Calcinosis in systemic sclerosis: subsets, distribution and complications. *Rheumatology.* 2016 Aug 23;55(9):1610–4.
30. Khanna D, Furst DE, Clements PJ, Allanore Y, Baron M, Czirjak L, Distler O, Foeidvari I, Kuwana M, Matucci-Cerinic M, Mayes M, Medsger T, Merkel PA,

- Pope JE, Selbold JR, Steen V, Stevens W, Denton CP. Standardization of the Modified Rodnan Skin Score for Use in Clinical Trials of Systemic Sclerosis. *Journal of Scleroderma and Related Disorders*. 2017 Feb 2;2(1):11–8.
31. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest*. American Society for Clinical Investigation; 2007 Mar;117(3):557–67.
 32. Morales-Cárdenas A, Pérez-Madrid C, Arias L, Ojeda P, Mahecha MP, Rojas-Villarraga A, Carillo-Baona JA, Anaya JM. Pulmonary involvement in systemic sclerosis. *Autoimmunity Reviews*. 2016 Nov;15(11):1094–108.
 33. Giacomelli R, Liakouli V, Berardicurti O, Ruscitti P, Di Benedetto P, Carubbi F, Guggino G, Di Bartolomeo S, Ciccia F, Triolo G, Cipriani P. Interstitial lung disease in systemic sclerosis: current and future treatment. *Rheumatology International*. Springer Berlin Heidelberg; 2017 Jan 6;37(6):853–63.
 34. Goh NSL, Veeraraghavan S, Desai SR, Cramer D, Hansell DM, Denton CP, Black CM, du Bois RM, Wells AU. Bronchoalveolar lavage cellular profiles in patients with systemic sclerosis-associated interstitial lung disease are not predictive of disease progression. *Arthritis & Rheumatism*. John Wiley & Sons, Ltd; 2007;56(6):2005–12.
 35. Bouros D, Wells AU, Nicholson AG, Colby TV, Polychronopoulos V, Pantelidis P, Haslam PL, Vassilakis DA, Black CM, du Bois RM. Histopathologic Subsets of Fibrosing Alveolitis in Patients with Systemic Sclerosis and Their Relationship to Outcome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Jun 15;165(12):1581–6.
 36. Simonneau G, PhD MAGM, MD IA, PhD DCM, PhD CDM, MD AG, Migueal Angel GS, Kumar RK, Landzberg M, Machado RF, Olschewski H, Robbins IM, Souza R. Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. Elsevier Inc; 2013 Dec 24;62(S):D34–D41.
 37. Launay D, Hachulla E, Humbert M. Pulmonary hypertension in systemic sclerosis: different phenotypes. 2017 Sep 14;:1–6.
 38. Mullin CJ, Mathai SC. New insights into the recognition, classification and management of systemic sclerosis-associated pulmonary hypertension. *Current Opinion in Rheumatology*. 2017 Aug;:1–7.
 39. Gyger G, Baron M. Systemic Sclerosis: Gastrointestinal Disease and Its Management. *Rheum Dis Clin North Am*. 2015 Aug;41(3):459–73.
 40. Jung S, Martin T, Schmittbuhl M, Huck O. The spectrum of orofacial manifestations in systemic sclerosis: a challenging management. *Oral Dis*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111); 2016 Jul 7;23(4):424–39.
 41. Alastal Y, Hammad T, Renni A, Khalil B, Pierre J, Kwaah B, Khuder S, Nawras A. Gastrointestinal manifestations associated with systemic sclerosis: results from the nationwide inpatient sample. *aog*. 2017;:1–6.

42. Aggarwal N, Lopez R, Gabbard S. Spectrum of esophageal dysmotility in systemic sclerosis on high-resolution esophageal manometry as defined by Chicago classification. *Diseases of the Esophagus*. 2017 Aug 26;:1–6.
43. Arif T, Masood Q, Sing J, Hassan I. Assessment of esophageal involvement in systemic sclerosis and morphea (localized scleroderma) by clinical, endoscopic, manometric and pH metric features: a prospective comparative hospital based study. *bmc gastroenterology*. 2015 Feb 18;:1–9.
44. Nagaraja V, McMahan ZH, Getzug T, Khanna D. Management of Gastrointestinal Involvement in Scleroderma. *Curr Treat Options in Rheum*. Springer International Publishing; 2015 Jan 17;1(1):82–105.
45. Richardson C, Agrawal R, Lee J, Almagor O, Nelson R, Varga J, Cuttica MJ, Dematte JDA, Chang RW, Hincliff ME. Esophageal dilatation and interstitial lung disease in systemic sclerosis: A cross-sectional study. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2016 Aug;46(1):109–14.
46. Savarino E, Furnari M, de Bortoli N, Martinucci I, Bodini G, Ghio M, Savarino V. Gastrointestinal involvement in systemic sclerosis. *Presse Med*. 2014 Oct;43(10 Pt 2):e279–91.
47. Nishikawa J, Mihara H, Sugiyama T. Systemic Sclerosis in Small Bowel. *YJCGH*. Elsevier Inc; 2013 Apr 1;11(4):A21.
48. Kowal-Bielecka O, Fransen J, Avouac J, Becker M, Kulak A, Allanore Y, Distler O, Clements P, Cutolo M, Czirjak L, Damjanov N, del Galdo F, Denton CP, Distler JHW, Foeldvari I, Figelstone K, Frerix M, Furst, DE, Guiducci S, Hunzelmann N, Khanna D, Matucci-Cerinic M, Herrick AL, van den Hoogen F, van Laar JM, Riemekasten G, Silver R, Smith V, Sulli A, Turner I, Tyndall A, Welling J, Wigley F, Valentini G, Walker UA, Zulian F, Müller-Ladner U. Update of EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis. *BMJ Publishing Group Ltd*; 2017. pp. 1327–39.
49. Emmanuel A. Current management of the gastrointestinal complications of systemic sclerosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. Nature Publishing Group; 2016 Aug;13(8):461–72.
50. Sallam H, McNearney TA, Chen JDZ. Systematic review: pathophysiology and management of gastrointestinal dysmotility in systemic sclerosis (scleroderma). *Aliment Pharmacol Ther*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111); 2006 Mar;23(6):691–712.
51. Galluccio F, Müller-Ladner U, Furst DE, Khanna D, Matucci-Cerinic M. Points to consider in renal involvement in systemic sclerosis. *Rheumatology*. 2017 Oct 5;56(suppl_5):v49–v52.
52. Rosato E, Gigante A, Barbano B, Gasperini ML, Cianci R, Muscaritoli M. Prognostic Factors of Renal Involvement in Systemic Sclerosis. *Kidney Blood Press Res*. 2018 Jun 26;43(3):682–9.

53. Steen VD, Medsger TA. Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972-2002. *Ann Rheum Dis*. BMJ Publishing Group Ltd; 2007 Jul;66(7):940–4.
54. Woodworth TG, Suliman YA, Li W, Furst DE, Clements P. Scleroderma renal crisis and renal involvement in systemic sclerosis. *Nat Rev Nephrol*. 2016 Sep 19;12(11):678–91.
55. Hunzelmann N, Genth E, Krieg T, Meurer M, Melchers I, Moinzadeh P, Riemekasten G, Schulze-Lohoff E, Sunderkoetter C, Müller-Ladner U. Organ-specific diagnosis in patients with systemic sclerosis. *Zeitschrift für Rheumatologie*. Springer-Verlag; 2008 Apr 18;67(4):334–40.
56. Mierau R, Roers A, Genth E. Laboratory diagnostics for systemic sclerosis. *Zeitschrift für Rheumatologie*. Springer-Verlag; 2007 May;66(3):206–11.
57. Rigamonti C, Shand LM, Feudjo M, Bunn CC, Black CM, Denton CP, Burroughs AK. Clinical features and prognosis of primary biliary cirrhosis associated with systemic sclerosis. *Gut*. BMJ Publishing Group; 2006 Mar;55(3):388–94.
58. Göring HD, Panzner M, Lakotta W, Ziemer A. [Coincidence of scleroderma and primary biliary cirrhosis. Results of a systematic study of a dermatologic patient sample]. *Hautarzt*. 1998 May;49(5):361–6.
59. Leung P, fregeau D, Coppel R, McNeilage L, Medsger T, Gershwin M. Autoantibodies to mitochondria in systemic sclerosis. *Arthritis & Rheumatism*. 2005 Sep 29;:1–7.
60. Gupta R, Seibold JR, Krishnan M, Steigerwald J. Precipitating autoantibodies to mitochondrial proteins in progressive systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol*. 2006 Jun 30;:1–9.
61. Avouac J, Sordet C, Depinay C, Ardizzone M, Vacher-Lavenu MC, Sibilia J, Kahan A, Allanore Y. Systemic sclerosis–associated Sjögren's syndrome and relationship to the limited cutaneous subtype: Results of a prospective study of sicca syndrome in 133 consecutive patients. *Arthritis & Rheumatism*. 2006;54(7):2243–9.
62. Tseng C-C, Yen J-H, Tsai W-C, Ou T-T, Wu C-C, Sung W-Y, Hsieh MC, Chang SJ. Increased incidence of Sjogren's syndrome in systemic sclerosis: A nationwide population study. *Autoimmunity*. 2015 Jun 9;48(7):438–44.
63. Becker MO. Systemische Sklerose. *Der Internist*. Springer Medizin; 2016 Nov 30;:1–9.
64. Montanelli G, Beretta L, Santaniello A. Effect of dihydropyridine calcium channel blockers and glucocorticoids on the prevention and development of scleroderma renal crisis in an Italian case series. *clinical and experimental rheumatology*. 2013 Jul 23;:1–5.

65. Steen VD, Medsger TA Jr. Case-control study of corticosteroids and other drugs that either precipitate or protect from the development of scleroderma renal crisis. *Arthritis & Rheumatism*. 2005 Sep 2;;1–7.
66. Fernández-Codina A, Walker KM, Pope JE, the Scleroderma Algorithm Group. Treatment Algorithms for Systemic Sclerosis According to Experts. *Arthritis & Rheumatology*. John Wiley & Sons, Ltd; 2018 Sep 17;70(11):1820–8.
67. Humbert M, Yaici A, de Groote P, Montani D, Sitbon O, Launay D, Gressin V, Guillemin L, Clerson P, Simonneau G, Hachulla E. Screening for pulmonary arterial hypertension in patients with systemic sclerosis: Clinical characteristics at diagnosis and long-term survival. *Arthritis & Rheumatism*. John Wiley & Sons, Ltd; 2011 Oct 28;63(11):3522–30.
68. Gordon J, Udeh U, Doobay K, Magro C, Wildman H, Davids M, Mersten J, Huang W, Lyman S, Crow M, Spiera R. Imatinib mesylate (Gleevec™) in the treatment of diffuse cutaneous systemic sclerosis: results of a 24-month open-label, extension phase, single-centre trial. *clinical and experimental rheumatology*. 2014 Nov 3;;1–5.
69. Richeldi L, Bois du RM, Raghu G, Azuma A, Brown KK, Costabel U, Cottin V, Fiaherly KR, Hansell DM, Inoue Y, Kim DS, Kolb M, Nicholson AG, Noble PW, Selman M, Taniguchi H, Brun M, Le Maulf F, Girard M, Stowasser S, Schlenker-Herceg R, Disse B, Collard HR. Efficacy and Safety of Nintedanib in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N Engl*. 2014 May 29;370(22):2071–82.
70. Fischer A, Zimovetz E, Ling C, Esser D, Schoof N. Humanistic and cost burden of systemic sclerosis: A review of the literature. *Autoimmunity Reviews*. The Authors; 2017 Nov 1;16(11):1147–54.
71. Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma: Mechanisms of disease. *N Engl*. 2009 Apr 24;;1–15.
72. Kahaleh B. Raynaud phenomenon and the vascular disease in scleroderma. *Current Opinion in Rheumatology*. 2004 Oct 13;;1–5.
73. Prescott R, Freemont A, Jones C, Hoyland J, Fielding P. Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *Journal of pathology*. 1991 May 20;;1–9.
74. Fleischmajer R, D JSPP. Capillary alterations in scleroderma. *Journal of the American Academy of Dermatology*. American Academy of Dermatology, Inc; 1980 Feb 1;2(2):161–70.
75. Bhattacharyya S, Wei J, Varga J. Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities. Nature Publishing Group. *Nature Publishing Group*; 2011 Oct 25;8(1):42–54.
76. Steen VD. Autoantibodies in Systemic Sclerosis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2005 Jul 26;;1–8.

77. Wu M, Mohan C. B-cells in systemic sclerosis. *Current Opinion in Rheumatology*. 2015 Nov;27(6):537–41.
78. Riemekasten G, Philippe A, Näther M, Slowinski T, Müller DN, Heidecke H, Matucci-Cerinic M, Czirjak L, Lukitsch I, Becker M, Kill A, van Laar JM, Carat R, Luft FC, Burmester GR, Hegner B, Dragun D. Involvement of functional autoantibodies against vascular receptors in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. BMJ Publishing Group Ltd; 2011 Mar;70(3):530–6.
79. Baroni S, Santillo M, Bevilacqua F, Luchetti M, Spadoni T, Mancini M, Fraticelli P, Sambo P, Funaro A, Kazlauskas A, Avvedimento E, Gabrielli A. Stimulatory Autoantibodies to the PDGF Receptor in Systemic Sclerosis. *N Engl J Med*. 2006 Jun 12;355(24):2471–80.
80. Terrier B, Tamby MC, Camoin L, Guilpain P, Berezne A, Tamas N, Broussard C, Hotellier F, Humbert M, Simonneau G, Guillemin L, Mouthon L. Antifibroblast antibodies from systemic sclerosis patients bind to α -enolase and are associated with interstitial lung disease. *Ann Rheum Dis*. BMJ Publishing Group Ltd; 2010 Feb;69(2):428–33.
81. Saito E, Fujimoto M, Hasegawa M, Komura K, Hamaguchi Y, Kaburagi Y, Nagaoka T, Takehara K, Tedder TF, Sato S. CD19-dependent B lymphocyte signaling thresholds influence skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse. *J Clin Invest*. American Society for Clinical Investigation; 2002 Jun;109(11):1453–62.
82. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K, Tedder TF. Altered B lymphocyte function induces systemic autoimmunity in systemic sclerosis. *Molecular Immunology*. 2004 Nov;41(12):1123–33.
83. Matsushita T, Hasegawa M, Yanaba K, Koder M, Takehara K, Sato S. Elevated serum BAFF levels in patients with systemic sclerosis: Enhanced BAFF signaling in systemic sclerosis B lymphocytes. *Arthritis & Rheumatism*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2005;54(1):192–201.
84. Matsushita T, Fujimoto M, Hasegawa M, Tanaka C, Kumada S, Ogawa F, Takehara K, Sato S. Elevated serum APRIL levels in patients with systemic sclerosis: distinct profiles of systemic sclerosis categorized by APRIL and BAFF. *J Rheumatol*. 2007 Sep 10;34(9):1811–8.
85. Hasegawa M. B lymphocytes: Shedding new light on the pathogenesis of systemic sclerosis. *The Journal of Dermatology*. Blackwell Publishing Ltd; 2010 Jan;37(1):3–10.
86. Francois A, Emmanuel C, Wachsmann D, Sibilica J, Bahram S, Alsaleh G, Gottenberg JE. B lymphocytes and B-cell activating factor promote collagen and profibrotic markers expression by dermal fibroblasts in systemic sclerosis. *Arthritis Research & Therapy*. 2013 Oct 28;15(4):R109.
87. Distler O, Maurer B. Systemische Sklerose – klinisches Bild, Diagnostik und Therapie. *Zeitschrift für Rheumatologie*. Springer Medizin; 2019 Jun 6;68(6):471–80.

88. Schioppo T, Ingegnoli F. Current perspective on rituximab in rheumatic diseases. *DDDT*. Dove Press; 2017;Volume 11:2891–904.
89. Bosello S, De Luca G, Tolusso B, Lama G, Angelucci C, Sica G, Ferraccioli G. B cells in systemic sclerosis: A possible target for therapy. *Autoimmunity Reviews*. Elsevier B.V; 2011 Aug 1;10(10):624–30.
90. Smith V, Pizzorni C, Riccieri V, Decuman S, Brusselle G, DE Pauw M, Deschepper E, Piette Y, Ruaro B, Sulli A, Vandecasteele E, Meisens K, De Keyser F, Cutolo M. Stabilization of Microcirculation in Patients with Early Systemic Sclerosis with Diffuse Skin Involvement following Rituximab Treatment: An Open-label Study. *J Rheumatol. The Journal of Rheumatology*; 2016 May;43(5):995–6.
91. Berghen N, Vulsteke J-B, Westhovens R, Lenaerts J, De Langhe E. Rituximab in systemic autoimmune rheumatic diseases: indications and practical use. *Acta Clinica Belgica*. Taylor & Francis; 2019 Jun 8;74(4):272–9.
92. Scher JU, Littman DR, Abramson SB. Review: Microbiome in Inflammatory Arthritis and Human Rheumatic Diseases. *Arthritis & Rheumatology*. John Wiley & Sons, Ltd; 2015 Dec 23;68(1):35–45.
93. Coit P, Sawalha AH. The human microbiome in rheumatic autoimmune diseases: A comprehensive review. *Clinical Immunology*. Elsevier Inc; 2016 Sep 1;170(C):70–9.
94. Rosenbaum JT, Asquith MJ. The Microbiome: a Revolution in Treatment for Rheumatic Diseases? *Curr Rheumatol Rep. Current Rheumatology Reports*; 2016 Oct 4;;1–7.
95. Bender P, Bürgin WB, Sculean A, Eick S. Serum antibody levels against *Porphyromonas gingivalis* in patients with and without rheumatoid arthritis – a systematic review and meta-analysis. *Clinical Oral Investigations*. *Clinical Oral Investigations*; 2016 Dec 17;;1–10.
96. Okada M, Kobayashi T, Ito S, Yokoyama T, Abe A, Murasawa A, Yoshie H. Periodontal Treatment Decreases Levels of Antibodies to *Porphyromonas gingivalis* and Citrulline in Patients With Rheumatoid Arthritis and Periodontitis. *Journal of Periodontology*. John Wiley & Sons, Ltd; 2013 Dec;84(12):e74–e84.
97. Volkmann ER, Chang Y-L, Barroso N, Furst DE, Clements PJ, Gorn AH, Roth BE, Conklin JL, Getzug T, Borneman J, McGovern DPB, Tong M, Jacobs JP, Braun J. Association of Systemic Sclerosis With a Unique Colonic Microbial Consortium. *Arthritis & Rheumatology*. 2016 May 26;68(6):1483–92.
98. Andréasson K, Alrawi Z, Persson A, Jönsson G, Marsal J. Intestinal dysbiosis is common in systemic sclerosis and associated with gastrointestinal and extraintestinal features of disease. *Arthritis Research & Therapy*. *Arthritis Research & Therapy*; 2016 Nov 23;;1–8.

99. Ruane D, Brane L, Reis BS, Cheong C, Poles J, Do Y, Zhu H, Velinzon K, Choi JH, Studt N, Mayer L, Lavelle EC, Steinman RM, Mucida D, Mehandru S. Lung dendritic cells induce migration of protective T cells to the gastrointestinal tract. *J Exp Med*. Rockefeller University Press; 2013 Aug 26;210(9):1871–88.
100. Tulic MK, Piche T, Verhasselt V. Lung-gut cross-talk: evidence, mechanisms and implications for the mucosal inflammatory diseases. *Clin Exp Allergy*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111); 2016 Mar 29;46(4):519–28.
101. He Y, Wen Q, Yao F, Xu D, Huang Y, Wang J. Gut–lung axis: The microbial contributions and clinical implications. *Critical Reviews in Microbiology*. 2016 Aug 25;43(1):81–95.
102. Budden KF, Gellatly SL, Wood DLA, Cooper MA, Morrison M, Hugenholtz P, Hansbro PM. Emerging pathogenic links between the microbiota and the gut–lung axis. *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group; 2016 Dec 1;:1–9.
103. Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2000 Jul;85(1):9–18–quiz18–21.
104. O'Reilly S, Huggle T, van Laar JM. T cells in systemic sclerosis: a reappraisal. *Rheumatology*. 2012 Aug 14;51(9):1540–9.
105. Mavilia C, Caletti C, Romagnani P, Carossino AM. Type 2 Helper T-Cell Predominance and High CD30 Expression in Systemic Sclerosis. *american journal of pathology*. 1997 Apr 11;:1–8.
106. Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol*. American Association of Immunologists; 2000 Dec 1;165(11):6107–15.
107. Kurasawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai H, Nawata Y, Takabayashi K, Iwamoto I. Increased Interleukin-17 production in patients with Systemic Sclerosis. *Arthritis & Rheumatism*. 2000 Oct 16;:1–9.
108. Fleischmajer R, Perlish JS, Reeves JRT. Cellular infiltrates in scleroderma skin. *Arthritis & Rheumatism*. 1977 Oct 11;:1–10.
109. Roumm A, Whiteside T, Medsger T, Rodnan G. Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. *Arthritis & Rheumatism*. 1984 Oct 15;:1–9.
110. Kalogerou A, Gelou E, Mountantonakis S, Settas L, Zafiriou E, Sakkas L. Early T cell activation in the skin from patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. BMJ Publishing Group Ltd; 2005 Aug;64(8):1233–5.
111. Li G, Larregina AT, Domsic RT, Stolz DB, Medsger TA Jr., Lafyatis R, Fuschiotti P. Skin-Resident Effector Memory CD8+CD28– T Cells Exhibit a Profibrotic Phenotype in Patients with Systemic Sclerosis. *Journal of Investigative Dermatology*. 2017 May;137(5):1042–50.

112. Ayano M, Tsukamoto H, Kohno K, Ueda N, Tanaka A, Mitoma H, Akahoshi M, Arinobu Y, Niuro H, Horiuchi T, Akashi K. Increased CD226 Expression on CD8 +T Cells Is Associated with Upregulated Cytokine Production and Endothelial Cell Injury in Patients with Systemic Sclerosis. *J Immunol*. 2015 Jul 17;195(3):892–900.
113. Almeida I, Silva SV, Fonseca AR, Silva I, Vasconcelos C, Lima M. T and NK Cell Phenotypic Abnormalities in Systemic Sclerosis: a Cohort Study and a Comprehensive Literature Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. Springer US; 2015 Oct 7;49(3):347–69.
114. Scherer HU, Burmester G-R, Riemekasten G. Targeting activated T cells: successful use of anti-CD25 monoclonal antibody basiliximab in a patient with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. BMJ Publishing Group Ltd; 2006 Sep;65(9):1245–7.
115. Becker MO, Bruckner C, Scherer HU, Wassermann N, Humrich JY, Hanitsch LG, Schneider U, Kawald A, Hanke K, Burmester GR, Riemekasten G. The monoclonal anti-CD25 antibody basiliximab for the treatment of progressive systemic sclerosis: an open-label study. *Ann Rheum Dis*. BMJ Publishing Group Ltd; 2011 Jul;70(7):1340–1.
116. Liston A, Gray DHD. Homeostatic control of regulatory T cell diversity. *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group; 2014 Jan 31;14(3):154–65.
117. Slobodin G, Rimar D. Regulatory T Cells in Systemic Sclerosis: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. Springer US; 2016 Jun 18;:1–8.
118. Radstake TRDJ, van Bon L, Broen J, Wenink M, Santegoets K, Deng Y, Hussaini A, Simms R, Cruikshank WW, Lafyatis R. Increased Frequency and Compromised Function of T Regulatory Cells in Systemic Sclerosis (SSc) Is Related to a Diminished CD69 and TGF β Expression. Unutmaz D, editor. *PLoS ONE*. Public Library of Science; 2009 Jun 22;4(6):e5981–11.
119. Broen JCA, Wolvers-Tettero ILM, Geurts-van Bon L, Vonk MC, Coenen MJH, Lafyatis R, Radstake TRDJ, Langerak AW. Skewed X chromosomal inactivation impacts T regulatory cell function in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2010 Nov 19;69(12):2213–6.
120. MacDonald K, BSc NAJD, PhD QH, MBBch JVD, PhD MKL, MBChB RB. Regulatory T cells produce profibrotic cytokines in the skin of patients with systemic sclerosis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Elsevier Ltd; 2015 Apr 1;135(4):946–9.
121. Hartnell A, Steel J, Turley H. Characterization of human sialoadhesin, a sialic acid binding receptor expressed by resident and inflammatory macrophage populations. *Blood*. 2000 Dec 15;:1–10.
122. Crocker PR, Paulson JC, Varki A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol*. Nature Publishing Group; 2007 Apr;7(4):255–66.

123. Pillai S, Netravali IA, Cariappa A, Mattoo H. Siglecs and Immune Regulation. *Annu Rev Immunol.* 2012 Apr 23;30(1):357–92.
124. York MR, Nagai T, Mangini AJ, Lemaire R, van Seventer JM, Lafyatis R. A macrophage marker, Siglec-1, is increased on circulating monocytes in patients with systemic sclerosis and induced by type I interferons and toll-like receptor agonists. *Arthritis & Rheumatism.* Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2007 Mar;56(3):1010–20.
125. Farina G, Lafyatis D, Lemaire R, Lafyatis R. A four-gene biomarker predicts skin disease in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Arthritis & Rheumatism.* John Wiley & Sons, Ltd; 2010 Feb;62(2):580–8.
126. Mora JR, Andrian von UH. Differentiation and homing of IgA-secreting cells. *Mucosal Immunol.* 2008 Mar;1(2):96–109.
127. Kunkel EJ, Kim CH, Lazarus NH, Vierra MA, Soler D, Bowman EP, Butcher EC. CCR10 expression is a common feature of circulating and mucosal epithelial tissue IgA Ab-secreting cells. *J Clin Invest.* 2003 Apr 1;111(7):1001–10.
128. Rott L, Briskin M, Andrew D, Berg E, Butcher E. A fundamental subdivision of circulating lymphocytes defined by adhesion to mucosal addressin cell adhesion molecule-1. Comparison with vascular cell adhesion molecule-1 and correlation with beta 7 integrins and memory differentiation. *the journal of immunology.* 2001 Aug 11;:1–11.
129. Mei HE, Hahne S, Redlin A, Hoyer BF, Wu K, Baganz L, Lisney AR, Alexander T, Rudolph B, Dörner T. Plasmablasts With a Mucosal Phenotype Contribute to Plasmacytosis in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis & Rheumatology.* 2017 Sep 27;69(10):2018–28.
130. Jaimes MC, Rojas OL, Kunkel EJ, Lazarus NH, Soler D, Butcher EC, Bass D, Angel J, Franco MA, Greenberg HB. Maturation and trafficking markers on rotavirus-specific B cells during acute infection and convalescence in children. *Journal of Virology.* American Society for Microbiology; 2004 Oct;78(20):10967–76.
131. Hoyer B, Adriano T, Qingyu C, Laleh K, Henrik M, Robert B, Tobias A, Radbruch A, Burmester GR, Hiepe F. A3.4 Expansion Of IGA-plasma cells as a sign for ear-nose-throat-involvement in granulomatosis with polyangiitis? *Ann Rheum Dis.* BMJ Publishing Group Ltd and European League Against Rheumatism; 2014 Mar 1;73(Suppl 1):A43–3.
132. Huang J, Li M, Tian Z, Hsieh E, Wang Q, Liu Y, Xu D, Huo Y, Zhao J, Guo X, Lai J, Hu C, Song N, Sun Q, Zhang F, Zhao F, Zeng X. Clinical and laboratory characteristics of systemic sclerosis patients with pulmonary arterial hypertension in China. *clinical and experimental rheumatology.* 2014 Nov 3;:1–7.
133. Murphy KM. *Janeway's Immunobiology.* 2011 Sep 11;:1–892.

134. Hoyer BF. Lebensdauer autoreaktiver Plasmazellen in einem Lupus- Maus-Modell. 2005 Mar 10;:1–121.
135. Galiè N, Humbert M, Vachiere J-L, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Hansmann G, Kiepetko W, Lancellotti P, Matucci M, McDonagh, Pierard LA, Trindade PT, Zompatri M, Hoeper M. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Heart J*. 2015 Dec 28;37(1):67–119.
136. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K. Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: Expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells. *Arthritis & Rheumatism*. 2004;50(6):1918–27.
137. Wang J, Watanabe T. Expression and Function of Fas during Differentiation and Activation of B Cells. *International Reviews of Immunology*. 2009 Jul 10;18(4):367–79.
138. López-Cacho JM, Gallardo S, Posada M, Aguerri M, Calzada D, Mayayo T, Gonzalez-Rodriguez ML, Rabasco AM, Lahoz C, Cardaba B. Association of immunological cell profiles with specific clinical phenotypes of scleroderma disease. *BioMed Research International*. Hindawi Publishing Corporation; 2014;2014(2):148293–8.
139. Mei HE, Frölich D, Giesecke C, Loddenkemper C, Reiter K, Schmidt S, Feist E, Daridon C, Tony HP, Radbruch A, Dörner T. Steady-state generation of mucosal IgA+ plasmablasts is not abrogated by B-cell depletion therapy with rituximab. *Blood*. American Society of Hematology; 2010 Dec 9;116(24):5181–90.
140. Ahern MJ, Smith MD. Rheumatoid arthritis. *Medical Journal of Australia*. John Wiley & Sons, Ltd; 1997 Feb;166(3):156–61.
141. Horta-Baas G, Romero-Figueroa MDS, Montiel-Jarquín AJ, Pizano-Zárate ML, García-Mena J, Ramírez-Durán N. Intestinal Dysbiosis and Rheumatoid Arthritis: A Link between Gut Microbiota and the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Journal of Immunology Research*. Hindawi; 2017;2017(2):1–13.
142. Bellocchi C, Volkmann ER. Update on the Gastrointestinal Microbiome in Systemic Sclerosis. *Current Rheumatology Reports*; 2018 Jun 23;:1–13.
143. Gómez-Bañuelos E, Mukherjee A, Darrah E, Andrade F. Rheumatoid Arthritis-Associated Mechanisms of *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *JCM*. 2019 Sep;8(9):1309–24.
144. Lemke A, Kraft M, Roth K, Riedel R, Lammerding D, Hauser AE. Long-lived plasma cells are generated in mucosal immune responses and contribute to the bone marrow plasma cell pool in mice. *Mucosal Immunol*. Nature Publishing Group; 2016 Jan;9(1):83–97.

145. Odendahl M, Jacobi A, Hansen A, Feist E, Hiepe F, Burmester G-R, Lipsky PE, Radbruch A, Dörner T. Disturbed Peripheral B Lymphocyte Homeostasis in Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol*. 2000 Nov 15;165(10):5970–9.
146. Chen Z, Kim S-J, Essani AB, Volin MV, Vila OM, Swedler W, Arami S, Volkov S, Sardin LV, Sweiss N, Shahrara S. Characterising the expression and function of CCL28 and its corresponding receptor, CCR10, in RA pathogenesis. *Ann Rheum Dis*. BMJ Publishing Group Ltd; 2015 Oct;74(10):1898–906.
147. Habiel DM. CCR10+ epithelial cells from idiopathic pulmonary fibrosis lungs drive remodeling. *JCI Insight*. American Society for Clinical Investigation; 2018 Aug 23;3(16):L119–22.
148. Manetti M. Emerging biomarkers in systemic sclerosis. *Current Opinion in Rheumatology*. 2016 Nov;28(6):606–12.
149. Wermuth PJ, Piera-Velazquez S, Rosenbloom J, Jimenez SA. Existing and novel biomarkers for precision medicine in systemic sclerosis. *Nature Publishing Group*. Springer US; 2018 Jun 15;:1–12.
150. Hickey PM, Lawrie A, Condliffe R. Circulating Protein Biomarkers in Systemic Sclerosis Related Pulmonary Arterial Hypertension: A Review of Published Data. *Front Med*. 2018 Jun 6;5:1809–7.
151. Chung L, Fairchild RM, Furst DE, Li S, Alkassab F, Bolster MB, Csuka ME, Derk CT, Domsic RT, Fischer A, Frech TM, Gomberg-Maltland M, Gordon JK, Hinchcliff M, HSU V, Himmers LK, Khanna D, Medsger TA, Molitor JA, Preston IR, Schioppa E, Shapiro L, Hant F, Silver R, Simms R, Varga J, Steen VD, Zamanian RT. Utility of B-type natriuretic peptides in the assessment of patients with systemic sclerosis-associated pulmonary hypertension in the PHAROS registry. *clinical and experimental rheumatology*. 2017 Sep;35 Suppl 106(4):106–13.
152. Wu W, Jordan S, Becker MO, Dobrota R, Maurer B, Fretheim H, Ye S, Siegert E, Allanore Y, Hoffmann-Void AM, Distler O. Prediction of progression of interstitial lung disease in patients with systemic sclerosis: the SPAR model. *Ann Rheum Dis*. 2018 Jun 6;:annrheumdis–2018–213201–7.
153. 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 Research & Therapy*; 2018 Mar 19;:1–9.
154. Tang J, Lei L, Pan J, Zhao C, Wen J. Higher levels of serum interleukin-35 are associated with the severity of pulmonary fibrosis and Th2 responses in patients with systemic sclerosis. *Rheumatology International*. Springer Berlin Heidelberg; 2018 May 30;0(0):0–0.

155. Giovannetti A, Rosato E, Renzi C, Maselli A, Gambardella L, Giammarioli AM, Palango P, Paoletti P, Psiarri S, Saisano F, Malorni W, Pierdominici M. Analyses of T cell phenotype and function reveal an altered T cell homeostasis in systemic sclerosis. *Clinical Immunology*. 2010 Oct;137(1):122–33.

7 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Georg Tilgner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Rolle von Plasmablasten mit einem mukosalen Phänotyp als Biomarker bei Systemischer Sklerose“ 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

8 Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Georg Tilgner hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Kongressbeitrag 1: Tilgner G, Schulz A, Cheng Q, Martin J, Kedor C, Hiepe F, Hoyer B F, Mucosal Plasmablasts as biomarkers in Systemic Sclerosis, 124. Jahrestagung der Gesellschaft für Innere Medizin, Mannheim, April 2018.

Anteil im Einzelnen: Durchführung, Auswertung und Präsentation der Studie

Kongressbeitrag 2: Tilgner G, Schulz A, Cheng Q, Martin J, Kedor C, Hiepe F, Hoyer B F, Mucosal Plasmablasts as biomarkers in Systemic Sclerosis, 46. Kongress der Gesellschaft für Rheumatologie, Mannheim, September 2018

Anteil im Einzelnen: Durchführung, Auswertung und Präsentation der Studie

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

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

Danksagung

Besonderer Dank gilt meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Bimba Hoyer, für die Entwicklung des Themas, der Bereitstellung der finanziellen Mittel sowie der Arbeitsplätze im Deutschen Rheumaforschungszentrum Berlin und dem Rheumatologischen Forschungslabor der Charité Berlin, sowie gewissenhafte Betreuung.

Außerdem bedanke ich mich bei Dr. rer. nat. Henrik Mei für die zahlreichen Ratschläge und Ideen während des Projektes.

Jonas Martin und Dr. Qingyu Cheng gebührt Dank für die praktische Einarbeitung im Labor. Speziell Jonas Martin danke ich gleichermaßen für die sich anschließende praktische und theoretische Unterstützung, sowie fortwährende Freundschaft.

Persönlicher Dank gilt meinen Eltern, die mich auf meinen bisherigen Wegen unaufhörlich unterstützt und gefördert haben. Diana danke ich für ihren jahrelangen freundschaftlichen Rückhalt, der mir die Kraft und Motivation gab, mich dieser Arbeit zu widmen.

Recht herzlich gedankt sei allen Personen, die ihr Blut und ihre Zeit für diese Arbeit zur Verfügung gestellt haben.