

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

DISSERTATION

**Expression von Angiotensin- und Endothelin-Rezeptoren
auf mononukleären Zellen des peripheren Blutes
und deren funktionelle Bedeutung in der Systemischen Sklerose**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Judith Dora Mathilde Rademacher
aus Bonn

Datum der Promotion: 09.12.2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
Zusammenfassung	5
1. Abstrakt	5
1.1. Abstrakt in Deutsch	5
1.2. Abstrakt in Englisch	6
2. Einleitung	8
2.1. Systemische Sklerose	8
2.2. Angiotensin und Endothelin in der Systemischen Sklerose	9
2.3. Zielstellungen	10
3. Methodik	11
3.1. Gewinnung und Isolierung der PBMC	11
3.2. Durchflusszytometrie	11
3.2.1. Extra- und intrazelluläre Färbung	11
3.2.2. Durchflusszytometrie und Auswertung der Daten	12
3.3. PCR	13
3.4. In-vitro IgG-Stimulation	14
3.5. Bestimmung der Autoantikörpertiter	14
3.6. Statistische Analyse	14
4. Ergebnisse	15
4.1. Charakterisierung des Patientenkollektivs	15
4.2. Analyse der Proteinexpression der vaskulären Rezeptoren	15
4.2.1. Vergleich der Rezeptorproteinexpression von Patienten und Gesunden	15
4.2.2. Publikation 1: Zusammenhang mit Alter, Geschlecht und Krankheitsdauer	15
4.2.3. Publikation 2: Zusammenhang mit der Klinik der SSc-Patienten	16
4.2.4. Publikation 3: Monozytäre Rezeptor Imbalance	16

Inhaltsverzeichnis

4.3.	Autoantikörper-Wirkung auf PBMC	16
4.3.1.	Publikation 1: Rezeptorvermittelte CCL18-Sekretion	17
4.3.2.	Publikation 3: Rezeptor Imbalance beeinflusst CCL18-Sekretion	17
4.4.	Therapieeffekte auf Autoantikörpertiter	17
5.	Diskussion	18
5.1.	Angiotensin- und Endothelin-Rezeptorexpression	18
5.2.	Imbalance der Angiotensin- und Endothelin-Rezeptorisotypen	19
5.3.	Rezeptorvermittelte Effekte der Autoantikörper	20
5.4.	Funktionelle Autoantikörper in der Systemischen Sklerose	20
5.5.	Limitationen und Ausblick	21
6.	Literaturverzeichnis	22
	Eidesstattliche Versicherung	25
	Anteilserklärung an den ausgewählten Publikationen	26
	Publikation 1	27
	Publikation 2	41
	Publikation 3	55
	Lebenslauf	60
	Publikationsliste	62
	Danksagung	63

Abkürzungsverzeichnis

AT₁R	Angiotensin II – Rezeptor Typ1
AT₂R	Angiotensin II – Rezeptor Typ2
BSA	Bovine Serum Albumine
CCL18	Chemokine(CC-Motif)-Ligand 18
CFL405	Cruz Fluor™ 405
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Complementary Desoxyribonucleic Acid, komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cy5	Cyanine 5
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ETAR	Endothelin-Rezeptor Typ A
ETBR	Endothelin-Rezeptor Typ B
EULAR	European League Against Rheumatism
EUSTAR	EULAR Scleroderma Trials and Research
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HD	Healthy Donor, Gesunde Spender
HD-IgG	Immunglobulin G aus dem Serum gesunder Spender
IgG	Immunglobulin G
IL-8	Interleukin 8
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid, Boten-RNA
mRSS	Modified Rodnan Skin Score, modifizierter Hautscore nach Rodnan
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
SSc	Systemische Sklerose
SSc-IgG	Immunglobulin G aus dem Serum von Patienten mit Systemischer Sklerose
EFA 1	Elongation Factor 1 alpha 1
AGTR1/2	Für AT1R/AT2R kodierendes Gen
EDNRA/B	Für ETAR/ETBR kodierendes Gen

Anmerkung: Aus Gründen der besseren Lesbarkeit werden in der vorliegenden Arbeit nur die maskulinen Formen verwendet, es sind jedoch alle Personen gemeint.

Zusammenfassung

1. Abstrakt

1.1. Abstrakt in Deutsch

Einleitung: Patienten mit Systemischer Sklerose (SSc) besitzen funktionelle Autoantikörper gegen den Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 (AT₁R) sowie gegen den Endothelin-1-Rezeptor Typ A (ET_AR). In den ausgewählten Publikationen werden die Expression dieser Rezeptoren sowie die ihrer funktionellen Gegenspieler AT₂R und ET_BR, deren Zusammenhang mit klinischen Manifestationen der SSc sowie die über diese Rezeptoren vermittelten pathologischen Effekte der Autoantikörper analysiert.

Methoden: Die Expression von AT₁R, AT₂R, ET_AR und ET_BR von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) von SSc-Patienten und Gesunden wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt, mittels Realtime-PCR verifiziert und anschließend mit den klinischen Daten der Patienten verglichen. Außerdem wurden PBMC von Patienten und gesunden Spendern nach Bestimmung der Rezeptorexpression *in vitro* mit Immunglobulin G von SSc-Patienten sowie von Gesunden stimuliert. Mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay [ELISA] wurden anschließend verschiedene Zytokine wie CCL18 im Überstand der PBMCs bestimmt. Deren Konzentrationen wurden mit dem klinischen Bild des jeweiligen IgG-Spenders verglichen und mit der monozytären Rezeptorexpression korreliert.

Ergebnisse: PBMC der SSc-Patienten präsentierten eine veränderte Rezeptorproteinexpression verglichen mit Gesunden sowie eine erhöhte AT₁R/AT₂R-Ratio. Am Krankheitsbeginn bestand die höchste Rezeptorexpression. Die ET_AR/ET_BR-Ratio war reduziert bei SSc-Patienten mit Lungenfibrose und zeigte eine negative Korrelation mit dem die Fibrose widerspiegelnden modifizierten Hautscore nach Rodnan. Mit SSc-IgG stimulierte PBMC zeigten signifikant höhere IL8- und CCL18-Konzentrationen im Überstand als die mit IgG von Gesunden stimulierten. Die Sekretion der Zytokine wurde durch AT₁R- und ET_AR-Antagonisten reduziert. Die CCL18-Konzentration korrelierte positiv mit der monozytären AT₁R/AT₂R-Ratio sowie negativ mit der ET_AR/ET_BR-Ratio. Darüber hinaus war die CCL18-Sekretion statistisch abhängig von

Abstrakt

vaskulären Komplikationen des IgG-spendenden Patienten und der Zeit seit Beginn seiner Lungenfibrose.

Schlussfolgerung: Die Angiotensin- und Endothelin-Rezeptorexpression auf PBMC ist bei Patienten mit SSc verändert und korreliert mit verschiedenen Manifestationen der Erkrankung sowie deren Dauer. Die funktionellen AT₁R- und ET_AR-Autoantikörper vermitteln über diese Rezeptoren pathogene profibrotische Effekte wie die Sekretion von Zytokinen wie IL-8 und CCL18. Eine besondere Bedeutung scheint auch das Verhältnis der Rezeptorsubtypen zu spielen. Hohe monozytäre AT₁R/AT₂R- und niedrige ET_AR/ET_BR-Ratios entsprachen der höchsten CCL18-Sekretion nach Antikörperstimulation, was auf eine Verbindung zwischen der Rezeptorexpression und der monozytären Funktion hinweist. Da Patienten mit Lungenfibrose und hohem modifizierten Hautscore nach Rodnan eine reduzierte ET_AR/ET_BR-Ratio zeigten, könnte die ATR- und ETR-Imbalance die Effekte der funktionellen Autoantikörper in der Systemischen Sklerose beeinflussen und somit als Marker für Krankheitskomplikationen und therapeutische Optionen dienen.

1.2. Abstrakt in Englisch

Objective: Patients with systemic sclerosis (SSc) present functional autoantibodies against angiotensin II receptor type 1 (AT₁R) and endothelin-1 receptor type A (ET_AR). In the chosen papers the expression of the respective receptors as well as their functional counterparts AT₂R and ET_BR, their correlation with clinical manifestations of SSc and the autoantibodies' pathological effects mediated through these receptors was analyzed.

Methods: The expression of AT₁R, AT₂R, ET_AR and ET_BR on peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of SSc patients and healthy donors was measured by flow cytometry, their expression verified by real-time PCR and then compared with clinical data. Moreover, PBMC of healthy donors and patients with SSc were *in vitro* stimulated with immunoglobulin G (IgG) of patients with SSc and healthy donors upon detection of receptor expression. Afterwards, different cytokines like CCL18 were quantified in the PBMC supernatants by enzyme-linked immunosorbent assay [ELISA]. Their concentrations were correlated with receptor expression and compared with the IgG donor's clinical findings.

Abstrakt

Results: PBMC of patients with SSc presented a different receptor expression compared to age- and sex-matched healthy donors as well as an increased AT₁R /AT₂R ratio. Receptor expression was highest at disease onset. ET_AR/ET_BR was reduced in patients with lung fibrosis and correlated negatively with the skin fibrosis representing modified Rodnan skin score. PBMC stimulated with SSc-IgG showed significantly higher IL8 and CCL18 concentrations in their supernatants than PBMC stimulated with IgG of healthy donors. Cytokine secretion was reduced by AT₁R and ET_AR antagonists. CCL18 concentration correlated positively with the monocytic AT₁R/AT₂R ratio and negatively with ET_AR/ET_BR ratio. Moreover, high CCL18 secretion was associated to the vascular complications and lung fibrosis onset of the IgG donor.

Conclusion: Angiotensin and endothelin receptor expression is altered in patients with SSc and high receptor expression is associated with disease manifestations and disease onset. Functional autoantibodies against AT₁R and ET_AR mediate through their respective receptors profibrotic and inflammatory effects like the secretion of cytokines as CCL18 and IL8. The ratio of the receptor subtypes seems to play a crucial role. High monocytic AT₁R/AT₂R and low ET_AR/ET_BR ratios corresponded to the highest CCL18-secretion upon autoantibody-stimulation, which points towards a connection between receptor expression and monocytic function. As patients with lung fibrosis and high modified Rodnan skin score showed a reduced ET_AR/ET_BR ratio, ATR and ETR imbalance might influence the effects of the autoantibodies in SSc and thereby serve as a marker for disease complications and further therapeutic options.

2. Einleitung

2.1. Systemische Sklerose

Die Systemische Sklerose (SSc) ist eine heterogene chronisch-entzündliche rheumatische Erkrankung, die vor allem Frauen betrifft (Verhältnis 4-14:1)¹. Die häufigste Erstmanifestation ist das Raynaud-Syndrom¹. Neben einer Hautfibrose, die mittels modifiziertem Hautscore nach Rodnan quantifiziert werden kann, zeigt die Mehrheit der Patienten weitere Organ- und Gefäßmanifestationen. So entwickeln mehr als 70% eine pulmonale Beteiligung, die bis zu einer schwersten Lungenfibrose und pulmonal arteriellen Hypertonie führen kann und heutzutage die häufigste krankheitsbedingte Todesursache bei SSc-Patienten ist^{1,2}.

Drei wesentliche Prozesse scheinen die Pathophysiologie der Systemischen Sklerose zu bestimmen: [I] eine Störung der zellulären und humoralen Immunität, welche mit der Produktion von Autoantikörpern einhergeht, [II] eine mikrovaskuläre Dysfunktion sowie [III] eine Überproduktion von extrazellulärer Matrix^{1,3}. Innerhalb dieser Trias aus Autoimmunität, Gewebsfibrose und Vaskulopathie scheinen Entzündungsprozesse vor allem auch am Beginn der Erkrankung besonders wichtig zu sein und die nachfolgenden Veränderungen zu initiieren³. Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC), vor allem T-Zellen und Monozyten, von SSc-Patienten infiltrieren das betroffene Gewebe und tragen somit zur Fibrose bei⁴. Hierbei differenzieren zirkulierende Monozyten zu Makrophagen, Kollagen-produzierenden Fibroblasten und Myofibroblasten^{5,6}. Bereits die zirkulierenden Monozyten weisen bei Patienten mit SSc einen fibrogenen, aktivierten Phänotyp auf und liegen im Blut in erhöhter Zahl vor⁶.

Einer der Marker für die alternative Aktivierung der Monozyten ist der Chemokine(CC-Motif)-Ligand 18 (CCL18)⁷. Dieser vermittelt als profibrotisches Zytokin, das vor allem von alveolären Makrophagen, aber auch von Monozyten produziert wird, eine gesteigerte Kollagenproduktion⁸. Patienten mit Systemischer Sklerose haben erhöhte CCL18-Konzentrationen im Serum und in der mittels broncho-alveolären Lavage (BAL) gewonnenen Flüssigkeit⁹. Hohe CCL18-Level im Serum von Patienten mit SSc sind mit einer erhöhten Inzidenz der interstitiellen Lungenerkrankung und Mortalität assoziiert⁹.

Die Therapie der SSc wird dadurch erschwert, dass die genaue Pathophysiologie der Erkrankung bislang unbekannt ist. Neben der klassischen immunsuppressiven Therapie mit zum Beispiel Methotrexat oder Cyclophosphamid, wobei letzteres vor allem bei pulmonaler Beteiligung zum Einsatz kommt, wird aufgrund der hohen Therapie-

assoziierten Mortalität nur in schweren Einzelfällen eine hämatopoetische Stammzelltransplantation eingesetzt¹⁰. Außerdem ermöglicht die Identifizierung von Schlüsselmolekülen und –prozessen zunehmend auch den Einsatz einer so genannten Targeted Therapy, also zielgerichteten Therapie, wie in Form einer Endothelin-Rezeptorblockade^{10,11}.

2.2. Angiotensin und Endothelin in der Systemischen Sklerose

Studien, die zeigen, dass Patienten mit SSc von vasoaktiven Therapien profitieren, bestärken die hypothetische Bedeutung von Angiotensin und Endothelin in der Pathophysiologie der SSc¹⁰. So konnte durch eine frühzeitige Behandlung mit Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmern (ACE-Hemmer) bzw. Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten (Sartane) die Mortalität der Patienten durch renale Krisen deutlich verringert werden. Endothelin-Rezeptor-Blocker wie Bosentan vermindern das Auftreten neuer digitaler Ulzera und verbessern die Prognose und Hämodynamik von Patienten mit pulmonal arterieller Hypertonie¹⁰.

Patienten mit SSc haben erhöhte Serumlevel der vasoaktiven Peptide Angiotensin II und Endothelin-1, die ihre Effekte über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermitteln^{12,13}. Angiotensin wirkt über die hochaffinen Rezeptorsubtypen AT₁R und AT₂R. Während die Bindung an AT₁R zu Entzündung, Fibrose und Apoptose führen kann, werden dem als funktionellen Gegenspieler betrachteten AT₂R regenerative und das Gewebe schützende Effekte zugesprochen¹⁴. Auch Endothelin-1 vermittelt seine Effekte über zwei Rezeptoren¹³. Die Stimulation von ET_AR resultiert in einer Vasokonstriktion, ET_BR hingegen ist in der Lage, sowohl eine Vasodilatation als auch eine Vasokonstriktion zu vermitteln¹⁵. Über beide Endothelinrezeptoren scheint es zu einem Gewebsremodelling über Fibrose, Inflammation, Hypertrophie und Apoptose zu kommen¹³. Die zum größten Teil gegensätzlichen über die verschiedenen Rezeptorsubtypen vermittelten Wirkungen führen dazu, dass Veränderungen im jeweiligen Verhältnis der Rezeptorsubtypen, also der AT₁R/AT₂R- bzw der ET_AR/ET_BR-Ratio, in einer modifizierten Antwort auf eine Stimulation bzw. einer veränderten Signaltransduktion resultieren^{16,17}.

Neben dieser allgemeinen Aktivierung der Angiotensin- und Endothelin-Achse besitzen Patienten mit SSc erhöhte Serumentiter von funktionellen Autoantikörpern gegen Angiotensin II Rezeptor Typ 1 (AT₁R) und Endothelin-1 Rezeptor Typ A (ETAR)¹⁸. Dabei sind höhere Antikörpertiter mit schwerwiegenden Krankheitsmanifestationen wie der

pulmonal arteriellen Hypertonie, der Lungenfibrose und digitalen Ulzera sowie einer erhöhten Mortalität assoziiert¹⁸.

2.3. Zielstellungen

Ziel der vorliegenden Publikationen war es, die Bedeutung der funktionellen Autoantikörper, vor allem die gegen AT₁R und ET_AR gerichteten, für die Pathophysiologie der Systemischen Sklerose weiter zu erforschen. Dazu wurde ein besonderes Augenmerk auf die Expression der vaskulären Rezeptoren und die über diese vermittelten Effekte gelegt.

Dabei war es die Zielstellung der **Publikation 1** (Günther et al, Arthritis Research and Therapy 2014), zunächst die Expression von AT₁R und ET_AR auf den Immunzellen des peripheren Blutes von Patienten mit SSc im Vergleich zu Gesunden sowie deren Assoziation zu Organmanifestationen zu untersuchen. Des Weiteren sollte analysiert werden, ob die Autoantikörper über diese Rezeptoren die zirkulierenden Immunzellen aktivieren und welche Effekte eine derartige Stimulation bewirkt.

Neben den Autoantikörpern gegen AT₁R und ET_AR sind zahlreiche weitere Antikörper bei Patienten mit Systemischer Sklerose beschrieben worden^{19,20}. Die **Publikation 2** (Günther et al, Seminars in Immunopathology 2015) sollte einen aktuellen Überblick über die, vor allem in der Forschung der letzten Jahre verstärkt im Fokus stehenden, funktionellen Autoantikörper und deren Bedeutung in der Pathophysiologie und Krankheitsexpression der Systemischen Sklerose geben. Darüber hinaus wurde abermals die Expression der vaskulären Rezeptoren in einer größeren Patientenkohorte auf T-Zellen sowie den Einfluss von konventioneller immunsuppressiver Therapie wie Cyclophosphamid und neueren therapeutischen Ansätzen wie der Stammzelltransplantation auf die AT₁R- und ET_AR-Autoantikörpertiter untersucht.

In der **Publikation 3** (Rademacher et al, Journal of Rheumatology 2016) wurde die Expression der Angiotensin- und Endothelin-Rezeptoren auf Monozyten analysiert, da diese, wie wir in der ersten Publikation und andere Gruppen zeigen konnten, die höchste Rezeptorexpression verglichen mit anderen PBMC zeigen²¹. Hierbei analysierten wir neben AT₁R und ET_AR auch deren funktionelle Gegenspieler AT₂R und ET_BR sowie die entsprechende Ratio an einer größeren Patientenkohorte. Außerdem untersuchten wir die funktionelle Bedeutung dieser vier vaskulären Rezeptoren bzw. deren Verhältnis zueinander anhand von Stimulationsexperimenten mit AT₁R- und ET_AR-Autoantikörpern.

3. Methodik

3.1. Gewinnung und Isolierung der PBMC

In die Studien eingeschlossen wurden SSc-Patienten entsprechend der EULAR/ACR-Klassifikation von 2013²² sowie alters- und geschlechtsgematchte gesunde Spender. Nach ausführlicher Aufklärung und Einverständniserklärung auf Grundlage der Vota EA1/042/09, EA1/013/05 und EA1/160/10 der Ethikkommission der Charité wurde Blut abgenommen. Das klinische Assessment der Patienten erfolgte nach den EUSTAR(EULAR Scleroderma Trials and Research Group)-Standardprotokollen²³. Eine Lungenfibrose wurde mittels hochauflösender Computertomographie diagnostiziert. Anschließend wurden zunächst die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) mittels Dichtegradientenzentrifugation mit dem Trennmedium LSM 1077 (PAA Laboratories, Österreich) sowie einer Erythrozyten-Lyse isoliert.

3.2. Durchflusszytometrie

3.2.1. Extra- und intrazelluläre Färbung

Um unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern, wurden die isolierten PBMC zunächst in 1:10 verdünntem Flebogamma, gepoolten humanen Immunglobulinen (*Grifolds, Spanien*), inkubiert. Zwischen allen nun folgenden Schritten wurden die Zellen jeweils mit den entsprechenden Puffern gewaschen. Je eine Million Zellen wurden dann in 100µl der CD-Oberflächenantikörper (Tabelle 3.) in PBS/BSA gefärbt.

Anti-körper	Fluorochrom	Verdünnung	Spezies	Klon	Hersteller
CD3	APC Cy5	1:100 1:300	Maus	UCHT1	DRFZ
CD4	APC- Cy7	1:200	Maus	RPA- T4	BioLegend
CD8	FITC	1:400	Maus	GN11/ 134D7	DRFZ
CD19	PE	1:50 / 1:200	Maus	BU12	DRFZ
CD14	PE-Cy7	1:200	Maus	HCD14	BioLegend
Sekundärer	CFL405	1:100	Ziege	Sc- 362252	SantaCruz

Tabelle 3.1 Fluorochrom-konjugierte Antikörper

Antikörper		Verdünnung	Hersteller	Katalognr.
AT1R	<i>polyklonal</i>	1:50	<i>abcam</i>	ab124505
AT1R	<i>polyklonal</i>	1:100	<i>Santa Cruz</i>	sc-1173
AT2R	<i>polyklonal</i>	1:250	<i>Santa Cruz</i>	sc-9040
ETAR	<i>polyklonal</i>	1:100	<i>Santa Cruz</i>	sc-33535
ETBR	<i>monoklonal</i>	1:250	<i>abcam</i>	ab129102
Isotyp 1		1:100 1:250	<i>Santa Cruz</i>	sc-3888
Isotyp 2		1:50 1:250	<i>abcam</i>	ab27478

Tabelle 3.2 Primäre Antikörper, alle Hasen-IgG

Die oberflächenmarkierten PBMC wurden mit 4% Formaldehyd fixiert und mit 0,5% Saponin permeabilisiert. Anschließend wurden die intrazellulären unspezifischen Bindungsstellen mit Flebogamma blockiert, bevor die PBMC zur intrazellulären Färbung in 50µl des jeweiligen primären Antikörpers bzw. der Isotypenkontrollen (Tabelle 3.2) in

Methodik

PBS/BSA/Saponin 0,5% für 1h bei 4°C inkubiert wurden. Dann wurde der sekundäre Antikörper (Anti-Hase-IgG) für 45min ebenfalls bei 4°C inkubiert.

3.2.2. Durchflusszytometrie und Auswertung der Daten

Die Daten wurden an MACS Quant Durchflusszytometern (*Miltenyi Biotec, Deutschland*) sowie dem FACS LSR II „Fozzie“ (*BD Bioscience, USA*) erhoben, die Auswertung erfolgte mittels FlowJo 7.6.5. Software (*Tree Star, USA*). Zunächst wurde die Analyse auf die verschiedenen Leukozytenpopulationen, die mittels direkter Immunfluoreszenz markiert wurden, eingeschränkt. Das so genannte Gating erfolgte wie in Abbildung 3.1 dargestellt. Somit konnten folgende Populationen getrennt analysiert werden: T-Zellen (CD3+ Lymphozyten) und die Subgruppen T-Helferzellen (CD4+) und zytotoxische T-Zellen (CD8+), B-Zellen (CD19+ Lymphozyten) sowie Monozyten (CD14+).

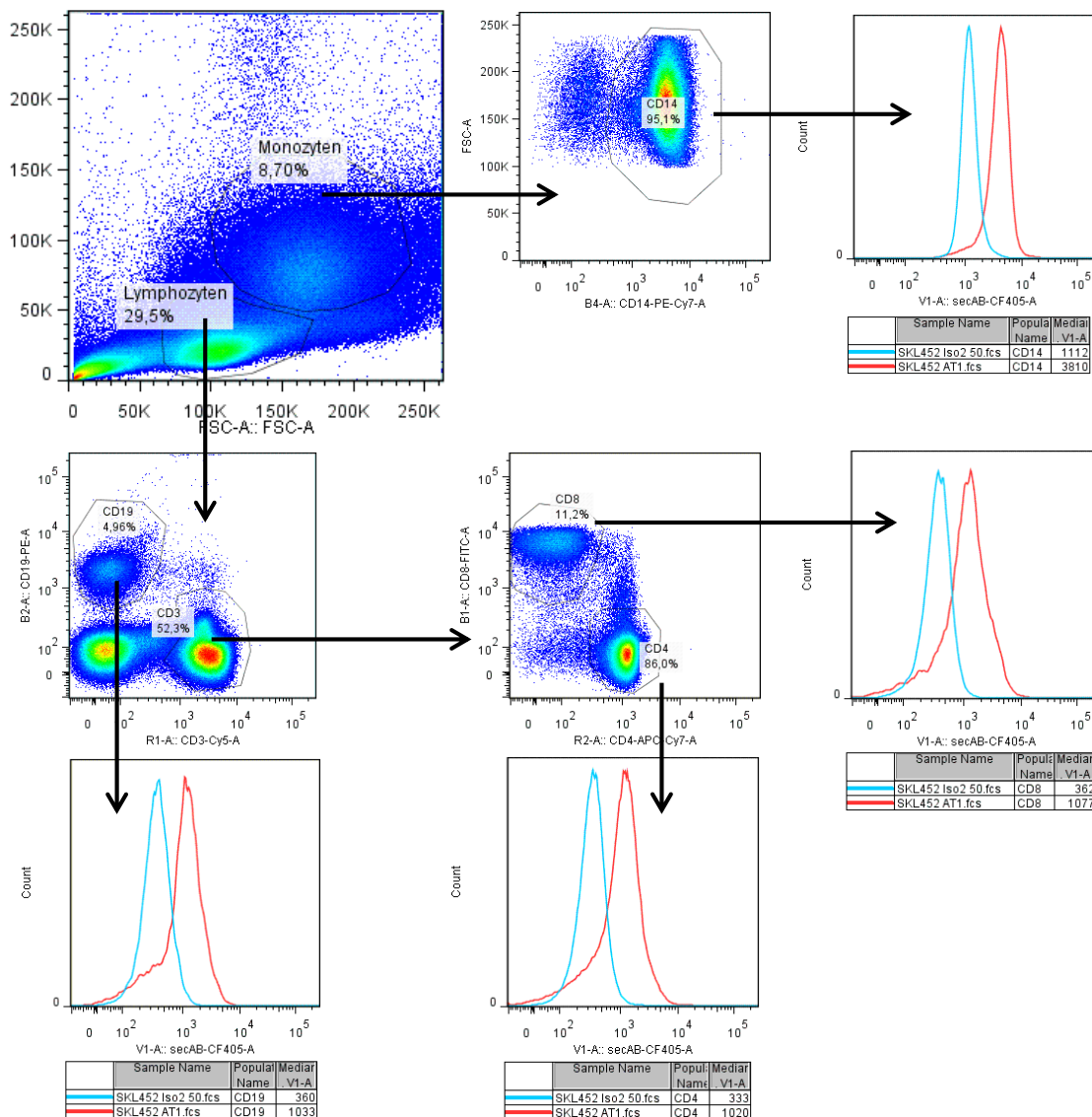


Abb. 3.1 Gating und Ermittlung der Rezeptordichte am Beispiel der Probe eines Patienten für AT1R

Methodik

Die Proteinexpression der Rezeptoren wurde anschließend auf folgenden zwei Wegen bestimmt: Zum einen analysierten wir die Rezeptordichte auf den Zellen über das Verhältnis der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der rezeptormarkierten Probe zur Isotypenkontrolle (Abb. 3.1). Zum anderen ermittelten wir die Frequenz der rezeptorpositiven Zellen ebenfalls für die einzelnen Leukozytenpopulationen (Abb. 3.2).

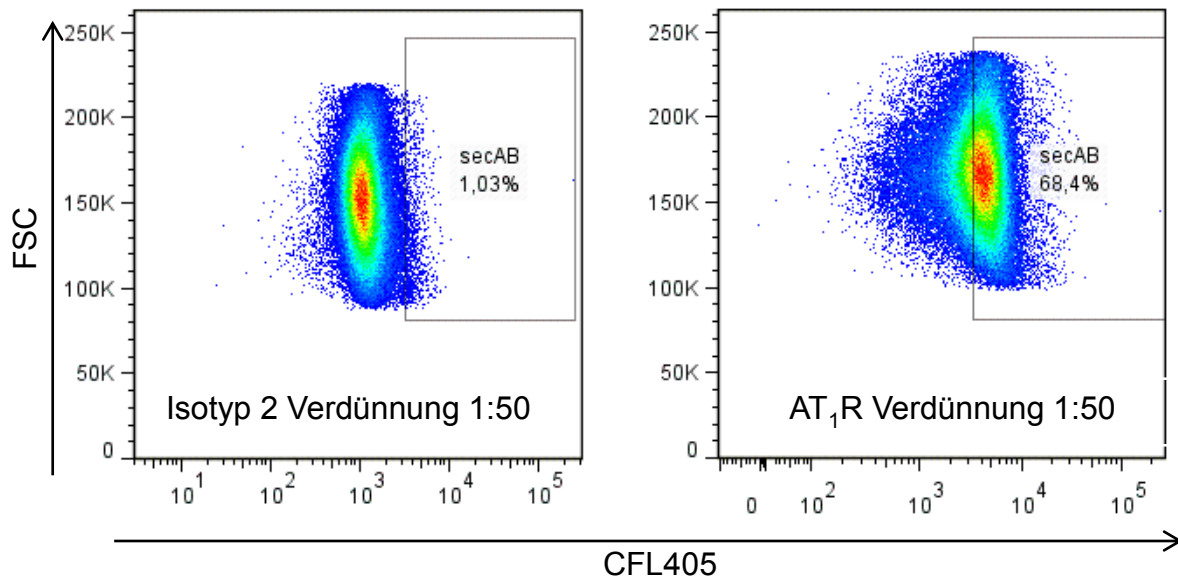


Abb. 3.2 Ermittlung der Frequenz der Rezeptorpositiven Zellen am Beispiel des AT₁R auf CD14+ Monozyten. FSC forward scatter, CFL405 Cruz Fluor™ 405.

3.3. PCR

Aus jeweils 5 Millionen zuvor isolierten PBMC wurde die RNA mittels NucleoSpin® RNAII-Kit (*Macherey-Nagel, Deutschland*) extrahiert und anschließend durch die Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase (*Promega, Deutschland*) in cDNA umgeschrieben. Mittels quantitativer Real-Time PCR (MxPro-Mx3005P (Stratagene, Europe)) unter Verwendung der in Tabelle 3.1 aufgeführten Primer (designt mit Primer Express Software (*Applied Biosystems*)) wurde die relative Expression der Rezeptor-mRNA im Verhältnis zum Housekeeper Gen des Eukaryotic translation elongation factor 1-alpha 1 (EF1A1) bestimmt.

Primer	Sequenz Forward	Sequenz Reverse	Produktgröße (bp)
AT1R (AGTR1)	5'TTC-AGC-CAG-CGT-CAG-TTT-CA3'	5'GGC-GGG-ACT-TCA-TTG-GGT3'	100
AT2R (AGTR2)	5'CAT-TGA-CCT-GGC-ACT-TCC-TT3'	5'AAA-CAC-ACT-GCG-GAG-CTT-CT3'	115
ETAR (EDNRA)	5'CAC-AGA-GCT-CAG-CTT-CCT-GGT-TA3'	5'GTA-ATT-TTA-GTC-TGC-TGG-GCA-ATA-G3'	101
ETBR (EDRNB)	5'TTG-TGT-CCT-GCC-TTG-TGT-TC3'	5'GGA-TGT-CAA-TGA-CGA-TGT-GC3'	150
EF1A1	5'GTT-GAT-ATG-GTT-CCT-GGC-AAG-C3'	5'GCC-AGC-TCC-AGC-AGC-CTT-C3'	144

Tabelle 3.1 Humane Primer. bp Basenpaare.

3.4. In-vitro IgG-Stimulation

PBMC von elf gesunden Spendern und zehn SSc-Patienten (Table 1, Publikation 3) wurden wie unter 3.1 beschrieben unter sterilen Bedingungen isoliert. Je 5 Millionen PBMC wurden für RNA- und Durchflusszytometrie-Analysen verwendet. Die restlichen PBMC wurden in Konzentrationen von 1,5 Millionen Zellen/mL in RPMI1640 Medium mit Glutamax(Life technologies, USA), 1%IgG freiem FCS, Penicillin 100U/mL und Streptomycin 100µg/mL (alle PAA Laboratories, Pasching, Austria) in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre (5%CO₂; 37°C) kultiviert. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit Flebogamma 1:10 blockiert. Die PBMC wurden mit 1mg/mL gepooltem IgG von 9 SSc-Patienten oder 5 HD für 8 Stunden stimuliert. Unstimulierte PBMC von jedem Spender dienten als Kontrollen. Das IgG war zuvor per Protein-G-Sepharose-Chromatographie und Dialyse aus Serumproben aufgereinigt worden und enthielt Autoantikörper gegen AT₁R und ETAR²⁴. Aus den Zellkultur-Überständen der PBMC wurden anschließend mittels Sandwich-ELISA die Zytokine IL-8 (mit dem anti-humanen IL-8 Capture-Antikörper H8A5 und Biotin-gekoppelter Detektionsantikörper E8N1 (beide BioLegend, USA)) und CCL-18 bestimmt (mit kommerziell erwerblichem ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA). Die Adsorption wurde bei 450nm mittels Spectramax190 Microplate Reader gemessen und mit der SoftMaxPro v5 Software ausgewertet (beide Molecular Devices, USA).

3.5. Bestimmung der Autoantikörpertiter

Die AT₁R- und ET_AR-Autoantikörpertiter der Seren von Patienten und Gesunden sowie der isolierten, aufgereinigten IgG-Proben wurden von der Firma CellTrend GmbH (Luckenwalde, Deutschland) im Rahmen einer bestehenden Kooperation mittels ELISA (One Lambda, USA) ermittelt¹⁸.

3.6. Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Prism5 Software (Graphpad Inc, USA). Da die erhobenen Daten nicht der Gauß'schen Normalverteilung entsprachen, wurden Spearman Rangkorrelationen, Man-Whitney-U-Test und Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet. Ein p-Wert<0.05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung des Patientenkollektivs

Die Untersuchung der Rezeptorexpression von Patienten mit SSc und gesunden Spendern erfolgte in zwei Studien, die jeweils andere Patientenkohorten betrachteten. In der **Publikation 1** wurden 18 Patienten und 14 alters- und geschlechtsgematchte Gesunde untersucht. In die darauffolgende zweite Studie wurden 39 Patienten eingeschlossen (Patientencharakteristik siehe Table 1, **Publikation 3**), von denen zunächst in der **Publikation 2** eine Subgruppe von 29 Patienten analysiert wurde.

4.2. Analyse der Proteinexpression der vaskulären Rezeptoren

Die Proteinexpression von AT₁R, AT₂R, ET_AR und ET_BR auf den PBMC wurde mittels Durchflusszytometrie quantitativ untersucht und die Rezeptorexpression der PBMC mittels PCR verifiziert.

4.2.1. Vergleich der Rezeptorproteinexpression von Patienten und Gesunden

Während die erste untersuchte Patientenkohorte eine im Vergleich zu gesunden Spendern verringerte Expression von AT₁R und ET_AR auf T-Zellen, B-Zellen und Monozyten zeigte (Figure 1, Publikation 1), hatten die in die zweite, größere Kohorte eingeschlossenen Patienten eine höhere Expression aller vier untersuchten Rezeptoren auf T-Zellen (Figure 1, Publikation 2) und Monozyten (Supplementary Figure 2, Publikation 3). Darüber hinaus konnten wir in der zweiten Kohorte das Verhältnis der beiden Angiotensin- und der Endothelin-Rezeptoren analysieren. Hierbei zeigten Patienten mit SSc im Vergleich zu Gesunden eine höhere Ratio der AT₁R/AT₂R-positiven Monozyten (Publikation 3, Figure 1A), wohingegen sich die ET_AR/ET_BR-Ratio nicht unterschied.

4.2.2. Publikation 1: Zusammenhang mit Alter, Geschlecht und Krankheitsdauer

Gesunde Spender zeigten anders als die Patienten zum einen eine negative Korrelation der AT₁R-Expression auf Monozyten und B-Zellen sowie der ET_AR-Expression auf B-Zellen mit dem Alter. Zum anderen hatten gesunde Frauen eine höhere Rezeptorproteinexpression als gesunde Männer. Bei den SSc-Patienten korrelierte die Frequenz AT₁R-positiver Monozyten negativ mit der Zeit seit dem Beginn sowohl des

Ergebnisse

Raynaud-Syndroms als auch seit dem Auftreten des ersten Nicht-Raynaud-Symptoms der Erkrankung (Figure 2, Publikation 1).

4.2.3. Publikation 2: Zusammenhang mit der Klinik der SSc-Patienten

In der Publikation 2 wurde die Rezeptorexpression auf den T-Zellen der Patienten untersucht. Hierbei zeigten auch die Patienten der größeren Kohorte wie in Publikation 1 eine negative Korrelation mit der Krankheitsdauer (AT₁R-Expression auf T-Helferzellen mit der Zeit seit Erstdiagnose sowie ET_AR-Expression auf T-Killerzellen mit der Zeit seit Beginn des Raynaud-Syndroms, Figure 2C,D, Publikation 2). Die AT₂R und die ET_AR-Expression unterschieden sich signifikant zwischen den Patienten mit verschiedenen Formen der SSc, wobei Patienten mit limitierter kutaner SSc einen geringeren prozentualen Anteil von rezeptorpositiven T-Zellen als Patienten mit diffuser kutaner SSc hatten (Figure 1D, Publikation 2). Auch Patienten mit zum Zeitpunkt der Untersuchung aktiver Krankheit (gemessen mit einem EUSTAR-Aktivitätsindex²⁵ von mindestens 3) zeigten einen statistischen Trend für eine höhere AT₁-Rezeptordichte (Figure 1C, Publikation 2).

4.2.4. Publikation 3: Monozytäre Rezeptor Imbalance

Im Fokus dieser Publikation stand das Verhältnis der jeweiligen funktionellen Gegenspieler AT₁R und AT₂R bzw. ET_AR und ET_BR. Die Monozyten der SSc-Patienten mit Lungenfibrose zeigten eine erhöhte ET_BR-Expression und eine reduzierte ET_AR/ET_BR Ratio verglichen mit den Patienten ohne diese Organmanifestation (Figure 1C, Publikation 3). Außerdem korrelierte die ET_AR/ET_BR-Ratio negativ mit dem modifizierten Hautscore nach Rodnan (mRSS, Figure 1D, Publikation 3).

4.3. Autoantikörper-Wirkung auf PBMC

PBMC von Gesunden und Patienten mit SSc exprimieren AT₁R und ET_AR sowie ihre funktionellen Gegenspieler. Aufgereinigtes IgG von Patienten mit SSc besteht u.a. aus Autoantikörpern gegen diese vaskulären Rezeptoren, was über eine Bestimmung der jeweiligen Antikörper-Titer im Rahmen der Kooperation von Celltrend, Luckenwalde, verifiziert wurde¹⁸. Um die Wirkung dieser stimulierenden Autoantikörper auf die PBMC zu untersuchen, wurden die Zellen *in vitro* mit IgG von Patienten und Gesunden stimuliert.

Ergebnisse

4.3.1. **Publikation 1: Rezeptorvermittelte CCL18-Sekretion**

Die Stimulation von PBMC gesunder Spender mit IgG von SSc-Patienten führte zu einer signifikant höheren Sekretion der profibrotischen Zytokine CCL18 und IL8 als eine Stimulation mit IgG von gesunden Spendern (Figure 4 D,E, Publikation 1). Die Sekretion wurde durch die Rezeptorantagonisten Valsartan (AT₁R-Blocker) und Sitaxsentan (ET_AR-Blocker) jeweils signifikant reduziert, für CCL18 um 29% durch Valsartan und 65% durch Sitaxsentan (Figure 5, Publikation 1). Die Konzentrationen der Zytokine in den Überständen der PBMC korrelierten mit bestimmten klinischen Manifestationen der SSc-Patienten, aus deren Serum das jeweilige zur Stimulation verwendete IgG aufgereinigt wurde. So zeigte sich für die CCL18-Konzentration eine negative Korrelation mit der Zeit seit Beginn der Lungenfibrose der IgG-Spender (Figure 7A, Publikation 1). Außerdem induzierte IgG von den Patienten mit vaskulären Komplikationen, also Digitalen Ulzera, pulmonal arterieller Hypertonie und oder renaler Krise, eine höhere CCL18-Sekretion (Figure 7B, Publikation 1).

4.3.2. **Publikation 3: Rezeptor Imbalance beeinflusst CCL18-Sekretion**

PBMC sowohl von gesunden Spendern als auch von SSc-Patienten ließen sich mit IgG von Patienten (SSc-IgG) zu höherer CCL18-Sekretion stimulieren als mit IgG von Gesunden (HD-IgG). Bei der Stimulation mit SSc-IgG sezernierten PBMC von Gesunden wiederum höhere CCL18-Konzentrationen verglichen mit PBMC von Patienten, wohingegen es bei HD-IgG keinen Unterschied gab (Figure 1B, Publikation 3).

Auch die Expression und das Verhältnis der Rezeptor-Subtypen auf den Monozyten hängen offenbar mit der über die funktionellen Autoantikörper vermittelten Sekretion von CCL18 zusammen. Die Ratio der AT₁R- zu den AT₂R-positiven Monozyten korrelierte positiv mit den CCL18-Konzentrationen der PBMC-Überstände nach Stimulation sowohl mit HD-IgG als auch mit SSc-IgG. Im Gegensatz dazu ergab sich eine negative Korrelation zwischen der CCL18-Konzentration und der Ratio aus ET_AR- und ET_BR-positiver Monozyten (Figure 2, Publikation 3).

4.4. Therapieeffekte auf Autoantikörpertiter

Die therapeutischen Optionen zur Behandlung der SSc sind vielseitig und deren Auswirkung auf den Titer der pathogenen Autoantikörper weitestgehend unbekannt. Cyclophosphamid-Boli beeinflussten die AT₁R- und ET_AR-Autoantikörper der einzelnen

Ergebnisse

behandelten Patienten nicht signifikant. Allerdings hatten die von der Therapie profitierenden Patienten bereits zu Therapiebeginn niedrigere Antikörpertiter als die Non-Responder (Figure 3, Publikation 2). Auch 11 SSc-Patienten, die eine hämatopoetische Stammzelltransplantation erhielten, wurden hinsichtlich ihrer Autoantikörpertiter untersucht. Nur bei 4 dieser 11 Patienten fielen die Titer nach der Therapie ab (Figure 4, Publikation 2).

5. Diskussion

Die Immunzellen des peripheren Blutes von Patienten mit Systemischer Sklerose und gesunden Spendern exprimieren AT₁- und ET_A-Rezeptoren sowie ihre funktionellen Gegenspieler AT₂R und ET_BR. Die Rezeptorexpression korreliert dabei mit verschiedenen Krankheitsmanifestationen. Gegen AT₁R und ET_AR gerichtete Autoantikörper vermitteln über diese Rezeptoren Effekte wie die Sekretion des profibrotischen Zytokins CCL18. Diese sind wiederum abhängig vom Verhältnis der jeweiligen Rezeptoren untereinander, also der Ratio aus AT₁R/AT₂R und ET_AR/ET_BR.

5.1. Angiotensin- und Endothelin-Rezeptorexpression

In den untersuchten Kohorten unterschied sich die Rezeptorexpression von SSc-Patienten und Gesunden. Die Patienten der ersten Studie zeigten eine niedrigere Expression als alters- und geschlechtsgematchte gesunde Spender, die Patienten der größeren Kohorte hingegen eine höhere Expression. Hierbei wiesen diejenigen Patienten die höchste Rezeptorexpression auf, die sich am Beginn ihrer Erkrankung befanden, eine Lungenfibrose, eine schwerere Hautfibrose oder eine besonders aktive Erkrankung hatten. Somit könnte der Unterschied zwischen den beiden Kohorten darin begründet sein, dass die zweite Studie mehr Patienten mit aktiver Krankheit (mittlerer EUSTAR-Aktivitätsindex²⁵ von 1,2 gegenüber 0,3 in der ersten Studie) und schwerwiegenden Organmanifestationen wie der Lungenfibrose (59% der Patienten versus 39%) einschloss.

Tinazzi et al hingegen beobachteten in der von ihnen untersuchten Kohorte keine Unterschiede in der Endothelin-Rezeptorexpression auf Immunzellen zwischen Patienten mit SSc und Gesunden²⁶, was ebenfalls durch die Heterogenität der Krankheit begründet sein könnte. Auch andere Gruppen beschrieben eine veränderte Angiotensin und Endothelin-Rezeptorexpression in der Systemischen Sklerose. So wurde über eine

erhöhte Anzahl von AT₁R- und AT₂R-positiven Zellen in Lungen von SSc-Patienten mit aktiver Lungenfibrose berichtet²⁷. In Haut- und Lungengewebe von Patienten mit SSc wurden ebenfalls eine erhöhte Endothelin-1-Rezeptorexpression verglichen mit Gesunden beschrieben^{28,29}.

Die Rezeptorexpression war außerdem von der klinischen Manifestation der SSc und der Krankheitsdauer abhängig. Die hohe Rezeptorexpression, vor allem von AT₁R und ET_AR zu Krankheitsbeginn und ebenso von ET_BR zu Beginn der Manifestation einer Lungenfibrose könnte Zeichen eines hohen Aktivierungspotentials durch die entsprechenden Autoantikörper sein.

Die Rezeptor-Hochregulation wäre somit ein Merkmal von früher sowie aktiver Erkrankung und schwerwiegenden Organmanifestationen.

5.2. Imbalance der Angiotensin- und Endothelin-Rezeptorisotypen

Unterschiede in der Expression der beiden Endothelin-Rezeptoren sowie deren Verhältnis zueinander beeinflussen die Effekte von Endothelin-1^{17,30}. Wie wir in der Publikation 3 zeigen konnten, verändern sie außerdem auch die Antwort der Monozyten auf eine Stimulation mit den gegen diese vaskulären Rezeptoren gerichteten funktionellen Autoantikörpern. In Lungengewebe von SSc-Patienten mit aktiver Lungenfibrose wurde eine höhere totale Endothelin-Rezeptor-mRNA-Expression gefunden, wobei die ET_AR-mRNA-Level reduziert, die ET_BR-mRNA hingegen deutlich erhöht waren²⁸. Dies entspricht unserer Beobachtung einer erhöhten ET_BR-Expression und einer reduzierten ET_AR/ET_BR Ratio bei Patienten mit einer Lungenfibrose (Figure 1C, Publikation 3). Des Weiteren korrelierte die ET_AR/ET_BR-Ratio negativ mit dem modifizierten Hautscore nach Rodnan (mRSS, Figure 1D, Publikation 3).

Patienten mit SSc präsentierten eine Imbalance der Angiotensin-Rezeptoren auf Monozyten, verglichen mit Gesunden hatten sie eine höhere AT₁R/AT₂R-Ratio (Figure 1A, Publikation 3). Das Überwiegen des AT₁R, welcher profibrotische Effekte wie eine Angiogenese, die Rekrutierung von Entzündungszellen, eine allgemeine zelluläre Proliferation sowie die Produktion von extrazellulärer Matrix vermittelt, gegenüber dem eher gewebsschutzenden AT₂R als funktionellem Gegenspieler könnte zur SSc-assoziierten Fibrose beitragen³¹. Dafür spricht auch die positive Korrelation des sezernierten CCL18 mit der monozytären AT₁R/AT₂R-Ratio (Figure 2A,B, Publikation 3).

5.3. Rezeptorvermittelte Effekte der Autoantikörper

Immunglobulin G von SSc-Patienten, das AT₁R- und ET_AR-Autoantikörper enthält, stimulierte PBMC zu einer signifikant höheren Sekretion von Zytokinen wie IL-8 und CCL18 als IgG von Gesunden (Figure 4D,E, 1. Publikation). Die jeweilige IgG-Stimulation führte bei PBMC von gesunden Spendern zu einer höheren CCL18-Konzentration in den Überständen als bei PBMC von SSc-Patienten (Figure 1C, Figure 3, Publikation 3). Dies könnte darin begründet sein, dass die Zellen der Patienten mit SSc bereits in vivo von zirkulierenden Autoantikörpern der jeweiligen Patienten stimuliert werden und es somit zu einer Desensibilisierung der Rezeptoren kommt. Auch könnten die Zellen der gesunden Spender eine höhere Menge bereits gespeicherten CCL18 besitzen, welches sie dann auf den ungewohnten Stimulationsreiz sezernieren, für den sie zusätzlich auch vulnerabler sind^{16,17}. Dies wäre auch eine mögliche Erklärung dafür, warum die jeweiligen CCL18-Konzentrationen eine stärkere Korrelation zu der monozytären Angiotensin- und Endothelin-Rezeptor-Ratio von Gesunden als derjenigen von SSc-Patienten zeigten. Höhere AT₁R/AT₂R- sowie im Gegensatz dazu niedrigere ET_AR/ET_BR-Ratio entsprachen den höchsten CCL18-Konzentrationen in den Überständen der mit IgG stimulierten PBMC. Dies könnte auf einen Zusammenhang zwischen dem Rezeptorungleichgewicht, wie wir es bei Patienten mit SSc bzw. mit Lungen- und Hautfibrose beobachteten, und der monozytären Funktion hinweisen.

5.4. Funktionelle Autoantikörper in der Systemischen Sklerose

Neben Autoantikörpern gegen AT₁R und ET_AR besitzen Patienten mit Systemischer Sklerose weitere gegen verschiedenste Strukturen gerichtete Antikörper. Während einige wie die antinukleären Autoantikörper (ANA) zur Diagnosestellung und Differenzierung der verschiedenen Formen und Organmanifestationen genutzt werden, scheinen andere Autoantikörper zur Entstehung der Erkrankung beizutragen^{1,20}. Einige dieser so genannten pathogenen Autoantikörper sind außerdem funktionell, wenn sie nach unserer Definition (Publikation 2) durch direkte Interaktion mit ihrem Antigen zu einer, außerdem im experimentellen Setting reproduzierbaren, Stimulation oder Inhibierung eines nachgeschalteten molekularen Signalweges führen. In der Systemischen Sklerose ist dies beschrieben für Autoantikörper gegen den Platelet-derived Growth Factor-Rezeptor(PDGFR), gegen den Östrogen-Rezeptor(ER), Muskarinrezeptor Typ 3(M₃R), gegen Endothelzellen(AECA), gegen Fibroblasten(AFA) und gegen den AT₁R und ET_AR (Publikation 2). Weder Cyclophosphamid- noch Stammzelltherapie hatte einen

signifikanten Effekt auf die AT₁R und ETAR-Autoantikörpertiter, allerdings zeigten die Responder auf eine Cyclophosphamidtherapie bereits vor Therapiebeginn eine niedrigere Rezeptorexpression, die Unterschiede waren jedoch – vermutlich der niedrigen Anzahl geschuldet – nicht signifikant. Jedoch könnten Autoantikörpertiter eventuell helfen, das Therapieansprechen vorauszusagen, falls weitere Analysen und Überprüfungen diese Assoziation bestätigen.

5.5. Limitationen und Ausblick

Die wesentlichen Limitationen unserer Studien sind die niedrige Anzahl der eingeschlossenen Patienten, vor allem der Patienten mit aktiver Erkrankung, sowie die Tatsache, dass die Messungen der Rezeptorexpressionen nur an jeweils einem Zeitpunkt erfolgten. Es wäre nun interessant, den Verlauf der Rezeptorexpressionen einzelner Patienten zu analysieren. So könnte untersucht werden, ob die negative Korrelation der Rezeptorexpression mit der Krankheitsdauer sowie der Zusammenhang mit der Entwicklung bestimmter Organmanifestationen sich ebenfalls im einzelnen Patienten wiederfinden lässt. Daraus könnte sich gegebenenfalls eine prognostische Wertigkeit der Rezeptorexpression ergeben. Auch wäre es interessant, die Effekte von verschiedenen Therapien auf die Rezeptorexpression zu analysieren analog zu den Untersuchungen deren Effekte auf die Autoantikörpertiter in der Publikation 2.

Die Korrelation der CCL18-Sekretion mit der jeweiligen Rezeptorratio lässt neben einem Wechsel- und Zusammenspiel von AT₁R und AT₂R sowie ET_AR und ET_BR, wie ihn andere bereits beschrieben^{12,32}, auch eine gegenseitige Regulierung zwischen den Angiotensin- und den Endothelin-Rezeptoren in der Systemischen Sklerose vermuten. Derartige Interaktionen zwischen den beiden Systemen und ihren Rezeptoren wurden u.a. von Rossi et al bereits 1999 beschrieben³³. Neben einer Kolo-kalisierung dieser Rezeptoren konnten auch AT₁R/ET_BR Heterodimere in einem Rattenmodell für Hypertension nachgewiesen werden³⁴. Ob auch die beobachteten Phänomene der veränderten Angiotensin- und Endothelin-Rezeptorexpression auf PBMC von Patienten mit SSc auf eine reziproke Stimulation oder gar Heterodimerbildung zurückzuführen sein könnten, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Unsere Daten unterstreichen die Bedeutung von Angiotensin- und Endothelin-Rezeptoren sowie die gegen diese gerichteten Autoantikörper für die Pathogenese der SSc. Es scheint somit wichtig, therapeutische Strategien, die gezielt auf diese Systeme wirken, wie die bereits erfolgreich eingesetzte Blockade eben dieser Rezeptoren, aber

auch die Beeinflussung der Antikörperproduktion z.B. durch B-Zell-depletierende Therapien weiter zu erforschen. Gegebenenfalls könnten die Rezeptorexpression oder die jeweiligen Antikörpertiter dabei helfen, Patienten, die auf diese Therapien ansprechen, sowie die optimalen Zeitpunkte dieser zu identifizieren.

6. Literaturverzeichnis

1. Klein-Weigel P, Opitz C, Riemekasten G. Systemic sclerosis - a systematic overview: part 1 - disease characteristics and classification, pathophysiologic concepts, and recommendations for diagnosis and surveillance. *VASA Zeitschrift für Gefasskrankheiten* 2011;40:6-19.
2. Tyndall AJ, Bannert B, Vonk M, et al. Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. *Annals of the rheumatic diseases* 2010;69:1809-15.
3. LeRoy EC. Systemic sclerosis. A vascular perspective. *Rheumatic diseases clinics of North America* 1996;22:675-94.
4. Fleischmajer R, Perlish JS, Reeves JR. Cellular infiltrates in scleroderma skin. *Arthritis and rheumatism* 1977;20:975-84.
5. Binai N, O'Reilly S, Griffiths B, van Laar JM, Huggle T. Differentiation potential of CD14+ monocytes into myofibroblasts in patients with systemic sclerosis. *PloS one* 2012;7:e33508.
6. Mathai SK, Gulati M, Peng X, et al. Circulating monocytes from systemic sclerosis patients with interstitial lung disease show an enhanced profibrotic phenotype. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2010;90:812-23.
7. Stifano G, Christmann RB. Macrophage Involvement in Systemic Sclerosis: Do We Need More Evidence? *Current rheumatology reports* 2015;18:2.
8. Atamas SP, Luzina IG, Choi J, et al. Pulmonary and activation-regulated chemokine stimulates collagen production in lung fibroblasts. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2003;29:743-9.
9. Prasse A, Pechkovsky DV, Toews GB, et al. CCL18 as an indicator of pulmonary fibrotic activity in idiopathic interstitial pneumonias and systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism* 2007;56:1685-93.

10. Kowal-Bielecka O, Landewe R, Avouac J, et al. EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group (EUSTAR). *Annals of the rheumatic diseases* 2009;68:620-8.
11. Distler O, Cozzio A. Systemic sclerosis and localized scleroderma-current concepts and novel targets for therapy. *Seminars in immunopathology* 2016;38:87-95.
12. Kawaguchi Y, Takagi K, Hara M, et al. Angiotensin II in the lesional skin of systemic sclerosis patients contributes to tissue fibrosis via angiotensin II type 1 receptors. *Arthritis and rheumatism* 2004;50:216-26.
13. Iglarz M, Clozel M. At the heart of tissue: endothelin system and end-organ damage. *Clinical science* 2010;119:453-63.
14. Namsolleck P, Recarti C, Foulquier S, Steckelings UM, Unger T. AT(2) receptor and tissue injury: therapeutic implications. *Current hypertension reports* 2014;16:416.
15. Sauvageau S, Thorin E, Caron A, Dupuis J. Endothelin-1-induced pulmonary vasoreactivity is regulated by ET(A) and ET(B) receptor interactions. *Journal of vascular research* 2007;44:375-81.
16. Chang Y, Wei W. Angiotensin II in inflammation, immunity and rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental immunology* 2014.
17. Horstmeyer A, Licht C, Scherr G, Eckes B, Krieg T. Signalling and regulation of collagen I synthesis by ET-1 and TGF-beta1. *The FEBS journal* 2005;272:6297-309.
18. Riemekasten G, Philippe A, Nather M, et al. Involvement of functional autoantibodies against vascular receptors in systemic sclerosis. *Annals of the rheumatic diseases* 2011;70:530-6.
19. Steen VD. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Seminars in arthritis and rheumatism* 2005;35:35-42.
20. Kill A, Riemekasten G. Functional autoantibodies in systemic sclerosis pathogenesis. *Current rheumatology reports* 2015;17:34.
21. Rasini E, Cosentino M, Marino F, et al. Angiotensin II type 1 receptor expression on human leukocyte subsets: a flow cytometric and RT-PCR study. *Regulatory peptides* 2006;134:69-74.
22. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Annals of the rheumatic diseases* 2013;72:1747-55.

23. Walker UA, Tyndall A, Czirjak L, et al. Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials And Research group database. *Annals of the rheumatic diseases* 2007;66:754-63.
24. Kill A, Tabeling C, Undeutsch R, et al. Autoantibodies to angiotensin and endothelin receptors in systemic sclerosis induce cellular and systemic events associated with disease pathogenesis. *Arthritis research & therapy* 2014;16:R29.
25. Valentini G, Bencivelli W, Bombardieri S, et al. European Scleroderma Study Group to define disease activity criteria for systemic sclerosis. III. Assessment of the construct validity of the preliminary activity criteria. *Annals of the rheumatic diseases* 2003;62:901-3.
26. Elisa T, Antonio P, Giuseppe P, et al. Endothelin Receptors Expressed by Immune Cells Are Involved in Modulation of Inflammation and in Fibrosis: Relevance to the Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Journal of immunology research* 2015;2015:147616.
27. Parra ER, Ruppert AD, Capelozzi VL. Angiotensin II type 1 and 2 receptors and lymphatic vessels modulate lung remodeling and fibrosis in systemic sclerosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Clinics* 2014;69:47-54.
28. Abraham DJ, Vancheeswaran R, Dashwood MR, et al. Increased levels of endothelin-1 and differential endothelin type A and B receptor expression in scleroderma-associated fibrotic lung disease. *The American journal of pathology* 1997;151:831-41.
29. Vancheeswaran R, Azam A, Black C, Dashwood MR. Localization of endothelin-1 and its binding sites in scleroderma skin. *The Journal of rheumatology* 1994;21:1268-76.
30. Bauer M, Wilkens H, Langer F, Schneider SO, Lausberg H, Schafers HJ. Selective upregulation of endothelin B receptor gene expression in severe pulmonary hypertension. *Circulation* 2002;105:1034-6.
31. Murphy AM, Wong AL, Bezuhly M. Modulation of angiotensin II signaling in the prevention of fibrosis. *Fibrogenesis & tissue repair* 2015;8:7.
32. Shiwen X, Leask A, Abraham DJ, Fonseca C. Endothelin receptor selectivity: evidence from in vitro and pre-clinical models of scleroderma. *European journal of clinical investigation* 2009;39 Suppl 2:19-26.
33. Rossi GP, Sacchetto A, Cesari M, Pessina AC. Interactions between endothelin-1 and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Cardiovascular research* 1999;43:300-7.
34. Zeng C, Wang Z, Asico LD, et al. Aberrant ETB receptor regulation of AT receptors in immortalized renal proximal tubule cells of spontaneously hypertensive rats. *Kidney international* 2005;68:623-31.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Judith Rademacher, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema *Expression von Angiotensin- und Endothelin-Rezeptoren auf mononukleären Zellen des peripheren Blutes und deren funktionelle Bedeutung in der Systemischen 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 beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

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

Datum

Unterschrift

Anteilsklärung an den ausgewählten Publikationen

Judith Rademacher hatte folgenden Anteil an den ausgewählten Publikationen:

Publikation 1:

Gunther J, Kill A, Becker MO, Heidecke H, **Rademacher J**, Siegert E, Radic M, Burmester GR, Dragun D, Riemekasten G. Angiotensin receptor type 1 and endothelin receptor type A on immune cells mediate migration and the expression of IL-8 and CCL18 when stimulated by autoantibodies from systemic sclerosis patients. Arthritis research & therapy 2014.

Beitrag im Einzelnen: Beteiligung an der Durchführung der durchflusszytometrischen Bestimmung der Rezeptorexpression, Beteiligung am Reviewprozess.

Publikation 2:

Gunther J, **Rademacher J**, van Laar JM, Siegert E, Riemekasten G. Functional autoantibodies in systemic sclerosis. Seminars in immunopathology 2015.

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der durchflusszytometrischen Bestimmung der Rezeptorexpression, dafür Rekrutierung der Probanden, Datenanalyse und -auswertung, Interpretation der Ergebnisse, Kritikgabe zum Inhalt des Reviews.

Publikation 3:

Rademacher J, Kill A, Mattat K, et al. Monocytic Angiotensin and Endothelin Receptor Imbalance Modulate Secretion of the Profibrotic Chemokine Ligand 18. The Journal of rheumatology 2015.

Beitrag im Einzelnen: maßgebliche Beteiligung an Konzept und Gestaltung der Studie, Etablierung und Durchführung der Experimente, Datenanalyse und statistische Auswertung, Manuskripterstellung, Durchführung des Reviewverfahrens.

Datum

Unterschrift

Publikation 1

Gunther J, Kill A, Becker MO, Heidecke H, Rademacher J, Siegert E, Radic M, Burmester GR, Dragun D, Riemekasten G. Angiotensin receptor type 1 and endothelin receptor type A on immune cells mediate migration and the expression of IL-8 and CCL18 when stimulated by autoantibodies from systemic sclerosis patients. *Arthritis research & therapy* 2014.

<http://dx.doi.org/10.1186/ar4503>

Publikation 2

Gunther J, Rademacher J, van Laar JM, Siegert E, Riemekasten G. Functional autoantibodies in systemic sclerosis. *Seminars in immunopathology* 2015.

<http://dx.doi.org/10.1007/s00281-015-0513-5>

Publikation 3

Rademacher J, Kill A, Mattat K, et al. Monocytic Angiotensin and Endothelin Receptor Imbalance Modulate Secretion of the Profibrotic Chemokine Ligand 18. The Journal of rheumatology 2015.

<http://dx.doi.org/10.3899/jrheum.150474>

Lebenslauf

Lebenslauf Judith Rademacher

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

Publikationsliste

Publikationen

Rademacher J, Kill A, Mattat K, Dragun D, Siegert E, Gunther J, Riemekasten G. Monocytic Angiotensin and Endothelin Receptor Imbalance Determines Secretion of the Profibrotic Chemokine Ligand CCL18. *Journal of Rheumatology*. März 2016.

Günther J, Rademacher J, Van Laar JM, Siegert E, Riemekasten G. Functional autoantibodies in systemic sclerosis. *Seminars in Immunopathology*. September 2015.

Günther J, Kill A, Becker MO, Heidecke H, Rademacher J, Siegert E, Radi M, Burmester GR, Dragun G, Riemekasten G. Angiotensin receptor type 1 and endothelin receptor type A on immune cells mediate migration and the expression of IL-8 and CCL18 when stimulated by autoantibodies from systemic sclerosis patients. *Arthritis Research & Therapy*. März 2014.

Posterpräsentationen

Rademacher J, Günther J, Kill A, Siegert E, Riemekasten G. Monocytic angiotensin and endothelin receptor expression and their clinical relevance in systemic sclerosis. 42. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, Düsseldorf, 2014.

Rademacher J, Günther J, Kill A, Siegert E, Riemekasten G. Monocytic Angiotensin and Endothelin Receptor Imbalance Determines Secretion of the Profibrotic Chemokine Ligand CCL18. American College of Rheumatology Kongress, Boston, USA, 2014.

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Gabriela Riemekasten für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen und für die Überlassung des spannenden Themas. Vielen Dank für ihre ansteckende Begeisterung für das Fach der Rheumatologie und die Systemische Sklerose, für anregende Diskussionen, konstruktive Ideen und die wöchentlichen fruchtbaren AG-Besprechungen sowie ihren kompetenten Rat und ihre Hilfe während sämtlicher Phasen dieser Doktorarbeit und darüber hinaus.

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Gerd-Rüdiger Burmester für die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Klinik anzufertigen und seine freundliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Ich bin Jeannine Günther zu tiefstem Dank verpflichtet für die geduldige Einarbeitung in das Thema, die Supervision meiner Arbeit, ihre ständige Hilfsbereitschaft, anregende Diskussionen und das Begleiten und Gegenlesen des Papers und dieser Arbeit.

Mein ganzer Dank gilt auch Anika Klaus, die mich in die Laborarbeit eingearbeitet, mir den ein oder anderen Ficoll abgenommen sowie unser Labor stets perfekt organisiert hat. Ich danke außerdem der ganzen AG Riemekasten, allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern. Es war und ist mir immer eine große Freude, mit euch arbeiten und diskutieren zu dürfen und auch außerhalb des Labors Zeit zu verbringen. Vielen Dank an Angela Kill für das Zeigen der RNA-Analyse, PCRs und der Arbeit mit Mäusen. Ich danke Jan Klocke für das Begleiten meiner ersten Schritte am Durchflusszytometer und seine Ratschläge. Herzlichen Dank an Jens Humrich, Philipp Enghard, Dimas Abdirama, Caroline von Spee-Mayer, Angelika Rose, Zehra Uyar, Anna-Sophie Grießbach und Valerie Langhans für eine gute Zeit im Labor und das wiederholte Blutspenden.

Elise Siegert danke ich für ihre Unterstützung nicht nur bei der Beschaffung von Patientenblut sowie dem wiederholten Korrekturlesen des Manuskriptes für das Paper. Kathrin Mattat sei herzlich für die Erstellung und Pflege der Patientendatei sowie der Organisation von Blut der Sprechstundenpatienten gedankt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Andreas Radbruch für die Möglichkeit, als Mitglied einer Liaisongruppe im Deutschen Rheumaforschungszentrum arbeiten zu dürfen. Vielen Dank an die Labmanager für die Herstellung der Puffer, Antikörper und das Aufreinigen des IgG und an die Damen der Laborküche. Ich danke auch Jenny Kirsch und Toralf Kaiser sowie Heike Hirseland für ihre Hilfe bei der Arbeit an den Durchflusszytometern.

Danksagung

Vor allem aber danke ich allen SSc-Patienten und gesunden Spendern für die Blutspenden. Ohne sie wären Forschung und diese Arbeit nicht möglich.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden für ihre immerwährende liebevolle Unterstützung bedanken. Diese Arbeit widme ich meiner Schwester Simone.