

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin II

(Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie, Klinische Immunologie,
Rheumatologie)

**Untersuchungen zur Rolle von iNKT-Zellen bei
Systemischer Sklerose**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Kettemann, Felix

2022

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. D. Schneidawind
2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. M. Döring
3. Berichterstatter: Privatdozent Dr. T. Daikeler

Tag der Disputation: 28.01.2022

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Abbildungsverzeichnis	6
2	Tabellenverzeichnis	6
3	Abkürzungsverzeichnis	7
4	Einleitung	8
4.1	Immunsystem und Autoimmunität.....	8
4.2	Systemische Sklerose	8
4.3	iNKT-Zellen	10
4.4	iNKT-Zellen und Autoimmunerkrankungen	13
4.5	Zielsetzung der Arbeit.....	14
5	Material und Methoden	16
5.1	Materialien.....	16
5.2	Methoden	18
5.2.1	Akquise von Patientenblutproben	18
5.2.2	Isolierung, Kryokonservierung & Auftauen von PBMC	19
5.2.3	Durchflusszytometrie	20
5.2.4	Extrazelluläre Färbung	20
5.2.5	Intrazelluläre Färbung.....	21
5.2.6	Zellkultur zur Zytokinmessung	21
5.2.7	Zellkultur mit α -GalCer	21
5.2.8	Datenanalyse	22
6	Ergebnisse	23
6.1	Deskriptive Analyse der Studienpopulation.....	23
6.1.1	Epidemiologische und klinische Charakterisierung	23
6.1.2	Immunsuppression	23
6.2	Immunphänotypisierung durch Analyse von Oberflächenantigenen	25

6.2.1	Quantifizierung von Lymphozytenpopulationen	25
6.2.2	Charakterisierung der iNKT-Zellpopulation	29
6.3	Funktionelle Untersuchungen an iNKT- und T-Zellen	30
6.3.1	Intrazelluläre Zytokinproduktion nach <i>in vitro</i> Stimulation	30
6.3.2	Expansionsverhalten von iNKT-Zellen nach <i>in vitro</i> Stimulation.....	32
6.4	Untersuchungen zu Krankheitsaktivität und iNKT-Zellzahl.....	33
6.4.1	Gruppierung nach Surrogatparametern der Krankheitsschwere	33
6.4.2	Korrelation von iNKT-Zellzahlen mit klinischen Parametern.....	35
7	Diskussion	36
7.1	Verminderte iNKT-Zellen bei SSc	36
7.2	Alterationen der iNKT-Zellfunktion und Autoimmunität.....	37
7.3	Zytokine und Immunhomöostase bei SSc.....	38
7.4	Korrelation zu Krankheitsaktivität.....	40
7.5	Ausblick: iNKT-Zellen und Immuntherapie	41
8	Zusammenfassung	43
9	Literaturverzeichnis	44
10	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	49
11	Danksagung	50

1 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Typische Klinik und Befallsmuster der SSc.....	9
Abbildung 2: Rezeptoren und Interaktion von T- und iNKT-Zellen.....	11
Abbildung 3: Interaktionen von iNKT-Zellen.....	13
Abbildung 4: Durchflusszytometrische Analyse von PBMC.....	26
Abbildung 5: Reduzierte iNKT-Zellzahlen und vermehrt T-Helferzellen bei SSc-Erkrankten.....	28
Abbildung 6: Qualitative Merkmale der iNKT-Zellen zeigten sich bei SSc im Vergleich zu Gesunden nicht verändert.....	29
Abbildung 7: Verstärkte IL-17 Produktion durch iNKT-Zellen bei SSc-Erkrankten nach <i>in vitro</i> Stimulation.....	31
Abbildung 8: T-Helferzellen von SSc-Patienten bilden verstärkt IL-17 und seltener IL-4.....	31
Abbildung 9: Defizitäre Expansion von iNKT-Zellen bei SSc.....	32
Abbildung 10: iNKT-Zellzahlen haben keine direkten Auswirkungen auf klinische Parameter.....	34
Abbildung 11: iNKT-Zellzahlen zeigen keine Korrelation mit Indikatoren der Krankheitsaktivität.....	35

2 **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Reagenzien.....	16
Tabelle 2: Stimulanzen.....	16
Tabelle 3: Medien und Puffer.....	16
Tabelle 4: Durchflusszytometrie-Reagenzien.....	17
Tabelle 5: Antikörper für Durchflusszytometrie.....	17
Tabelle 6: Geräte.....	18
Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien.....	18
Tabelle 8: Studienkollektiv.....	24

3 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
α -GalCer	α -Galaktosylceramid
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromol
2-ME	2-Mercaptoethanol
ACA	Anti-Zentromer-Antikörper
AK	Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
APC	Allophycocyanin
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
BV	BrilliantViolet
C	Celsius
CD	cluster of differentiation
CRP	C-reaktives Protein
CXCL	Chemokin-CXC-Ligand
Cy	Cyanin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco Phosphate Buffered Saline
DZ	dendritische Zellen
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalitis
FBS	Fetal Bovine Serum
FCM	Durchflusszytometrie
FcR	Fc-Rezeptor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FMO	Fluorescence-Minus-One
FSC-A	Forward-Scatter-Area
FSC-H	Forward-Scatter-Height
g	g-Kraft
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-koloniestimulierender Faktor
IE	Internationale Einheit
IFN	Interferon
IL	Interleukin

Abkürzung	Bedeutung
iNKT-Zellen	invariante natürliche Killer-T-Zellen
IS	Immunsuppression
MEN	Minimal Essential Medium
MFI	mediane Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRSS	modifizierter Rodnan-Skin-Score
MS	Multiple Sklerose
MWU	Mann-Whitney-U-Test
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NKT-Zellen	natürliche Killer-T-Zellen
NOD	non-obese-diabetic Mausstamm
NZB/W	New Zealand Black / White Mausstamm
p	Signifikanzwert
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PE	Phycoerythrin
PenStrep	Penicillin/Streptomycin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
R ²	Determinationskoeffizient
RA	rheumatoide Arthritis
RPMI	Roswell-Park-Memorial-Institute-Medium
SD	Standardabweichung
SSc	Systemische Sklerose
SSC-A	Sideward-Scatter-Area
TGF	Tumor-Growth-Factor
TNF	Tumornekrosefaktor
TZR	T-Zell-Rezeptor
UE	Untereinheit

4 Einleitung

4.1 Immunsystem und Autoimmunität

Gegen die in der Umwelt vorhandenen Pathogene steht dem menschlichen Körper eine effiziente Abwehr in Form des Immunsystems zur Verfügung. Ein ausgedehntes Netzwerk aus zellulären und löslichen Akteuren ermöglicht eine effektive Verteidigung gegen Angriffe von außen. Eine Infektion muss effektiv bekämpft werden, ohne durch überschießende Inflammation ausgedehnte Schäden am Körpergewebe zu verursachen. Jede Immunantwort ist deshalb ein fein austariertes Gleichgewicht aus hemmenden und fördernden Einflüssen. Fehler im Zusammenspiel dieses komplexen Systems können zu einer auf eigene Körperstrukturen gerichteten, fehlgeleiteten Immunreaktion führen. Dies manifestiert sich als Immundefekt. Das Immunsystem fehlinterpretiert hierbei körpereigene Antigene als fremd und leitet eine Entzündungsreaktion ein. Dies kann abhängig vom betroffenen Antigen in jedem Gewebe des menschlichen Organismus auftreten; beispielsweise an Gelenken, der Haut oder inneren Organen. Die Therapie autoimmuner Erkrankungen stellt die Medizin vor anhaltende Probleme. Dies ist unter anderem auf die im Detail immer noch ungeklärten Pathomechanismen, welche für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen verantwortlich sind, zurückzuführen. Der symptomatische Einsatz immunsupprimierender Medikamente erlaubt, die überschießende Immunreaktion zu reduzieren. Die Nebenwirkung einer stärkeren Anfälligkeit für Infektionen wird dabei in Kauf genommen. Kurative Therapiemöglichkeiten stehen in den meisten Fällen nicht zur Verfügung oder beinhalten, wie im Fall der Stammzelltransplantation, hohe Risiken für die Erkrankten.

4.2 Systemische Sklerose

Die Systemische Sklerose (SSc), früher Sklerodermie genannt, ist eine rheumatische, zur Gruppe der Kollagenosen gehörende, Autoimmunerkrankung. Ihre Inzidenz beträgt 5,6 Fälle pro 100000 Personenjahren in den USA [1]. Pathognomonisch ist die im Krankheitsverlauf zunehmende Sklerose der Haut, die durch eine vermehrte Ablagerung von Kollagen im Bindegewebe entsteht.

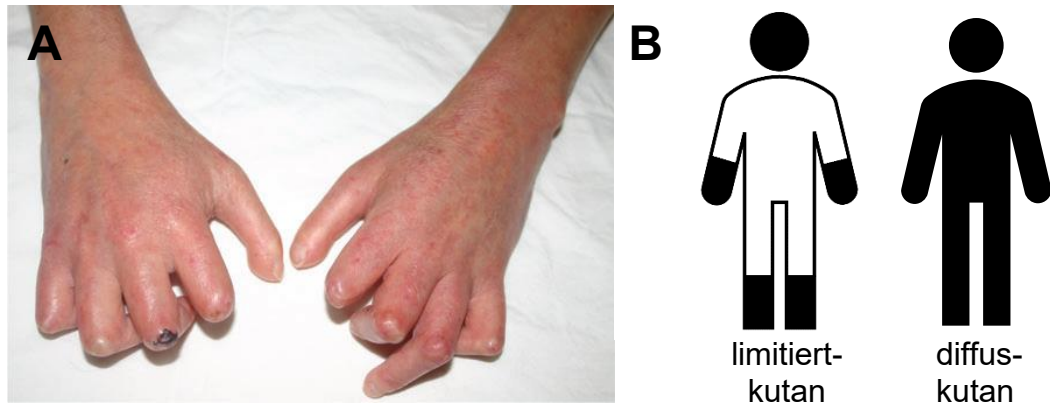


Abbildung 1: Typische Klinik und Befallsmuster der SSc

A Hände einer Patientin mit diffus-kutaner SSc. Erkennbar die sklerotischen Hautveränderungen, welche zum Verstreichen der Hautfalten und zu Flexionskontrakturen der Finger führen. Am rechten Mittelfinger zusätzlich erkennbares nekrotisches Ulkus. (aus: Katsumoto et al.; *Annual Reviews of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2011. 6:S.510) **B** Schematisch dargestellte Befallsmuster der klinischen SSc-Subtypen. Schwarz gekennzeichnet sind Hautareale, die betroffen sein können.

Die SSc zeigt sehr unterschiedliche Verlaufsformen und -geschwindigkeiten. Anhand der Lokalisation der Hautsklerose werden zwei Subtypen unterschieden. Ein auf die distalen Akren beschränktes Befallsmuster wird als limitiert-kutan klassifiziert. Demgegenüber steht die diffus-kutane SSc, die mit Hautsklerose am ganzen Körper und einer erhöhten Mortalität einhergeht [2]. Prognoseverschlechternd ist der Befall und die vitale Beeinträchtigung innerer Organe wie Lunge, Herz, Ösophagus oder Nieren. Eine solche Organbeteiligung ist bei einem Großteil der Todesfälle unter den Erkrankten zu finden [3]. Auch der Autoantikörper Anti-Scl70 ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert [4]. Die Pathogenese der SSc bleibt im Detail ungeklärt. Konsens herrscht über das Vorliegen vaskulärer und immunologischer Anomalitäten. Diese führen zu einer gestörten Gefäßpermeabilität, die im Initialstadium der Erkrankung zu Ödemen und zum Raynaud-Phänomen führen. Es folgt die Migration von T-Lymphozyten und eine chronische perivaskuläre Entzündung, in deren Verlauf die Hyperstimulation von Fibroblasten zu zunehmender Gewebefibrose führt [5]. Die Therapie erfolgt mit Immunsuppressiva und symptombezogen nach betroffenen Organen [6].

Neben der niedrigen Inzidenz wird die Erforschung der Erkrankung durch ihre große Heterogenität erschwert. Eine immunologische Beteiligung am Krankheitsgeschehen ist gesichert, jedoch ist bisher wenig über die genauen Mechanismen und ihre Bedeutung für die Pathogenese der Erkrankung bekannt [7]. Der klassische Mechanismus einer Autoimmunerkrankung ist die Produktion von gegen eigene Körperstrukturen gerichteten Antikörpern durch autoreaktive B-Zellen. Auch im Falle der SSc existieren pathognomonische Autoantikörper wie Anti-Scl70, Anti-Zentromer und Anti-RNA-Polymerase-III. Sie bilden jedoch nur einen Teilaspekt der Pathogenese der Erkrankung, es sind ebenfalls Veränderungen im Verhalten der T-Zellen belegt. Die Immunantwort des adaptiven Immunsystems besteht aus einer zellulär (Typ 1) oder humoral (Typ 2) dominierten Reaktion. Die Balance aus den beiden Armen wird durch T-Helferzellen reguliert. T_{H1} - oder T_{H2} -polarisierte T-Helferzellen steuern dies über die Sezernierung von Zytokinen. Im Falle der SSc scheint dieses Gleichgewicht in Richtung einer Typ 2 Immunantwort verschoben zu sein. Dies zeigt sich in einem erhöhten Serumspiegel typischer Typ 2-Zytokine, wie Interleukin(IL)-13 [8] und einer verstärkten T_{H2} -Polarisierung von T-Helferzellen in Hautläsionen und peripherem Blut SSc-Erkrankter [9]. Ein T_{H2} -Übergewicht wird allgemein mit der Entstehung von Fibrose in Verbindung gebracht [10]. Weiterhin wurden Abweichungen der Funktion und Anzahl regulatorischer T-Zellen und T_{H17} -Zellen beschrieben. Beide Zelltypen wirken antagonistisch zueinander. Die Aufgabe regulatorischer T-Zellen besteht in der Unterdrückung überschießender Immunreaktionen und Autoimmunität. Radstake et al. berichten, dass die Anzahl regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut SSc-Erkrankter zwar erhöht ist, die Zellen in vitro jedoch funktionell stark eingeschränkt sind [11]. T_{H17} -Zellen sezernieren Mediatoren, die pro-inflammatorisch und profibrotisch wirken. [12, 13].

4.3 iNKT-Zellen

Natürliche-Killer-T-(NKT)-Zellen sind eine ungewöhnliche Population von T-Lymphozyten. NKT-Zellen besitzen, wie alle Zellen des erworbenen Immunsystems, einen durch genetische Rekombination entstandenen T-Zellrezeptor (TZR). Namensgebend ist die zusätzliche Expression von

Rezeptoren, die charakteristisch für natürliche Killer (NK)-Zellen sind, wie NK1.1 bei Mäusen, NKG2D und CD161 beim Menschen. NKT-Zellen besitzen somit ebenfalls Rezeptoren, die dem angeborenen Immunsystem zugehören und besetzen eine Zwischenposition im sonst getrennten System von angeborener und erworbener Immunität. NKT-Zellen werden ferner in Typ I und Typ II NKT-Zellen unterschieden. Typ I NKT-Zellen zeichnen sich durch einen semi-invarianten TZR aus und werden deshalb auch als invariante natürliche Killer-T-Zellen oder iNKT-Zellen bezeichnet. Im Gegensatz zu herkömmlichen T-Lymphozyten besteht der iNKT-TZR stets aus der gleichen α -Untereinheit (UE) $V\alpha 24J\alpha 18$ kombiniert mit einem limitierten Repertoire von β -UE. Typ II NKT-Zellen verfügen demgegenüber über ein breiteres Spektrum an TZR. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich im Folgenden ausschließlich auf iNKT-Zellen.

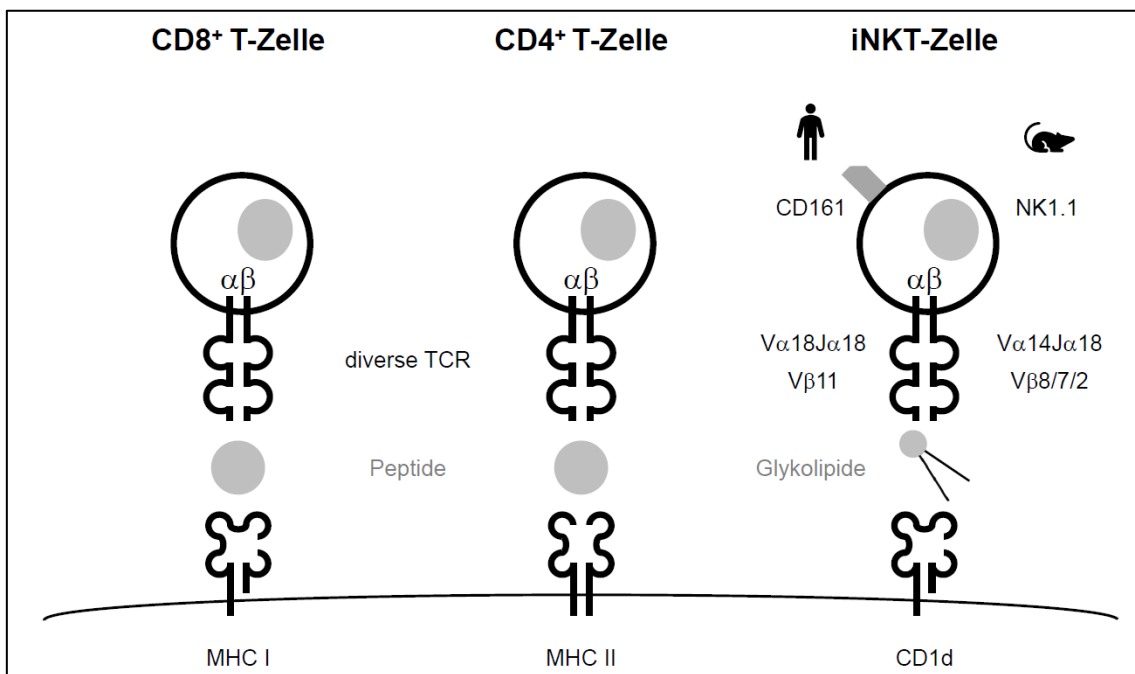


Abbildung 2: Rezeptoren und Interaktion von T- und iNKT-Zellen

Schematische Darstellung der T-Zell-Rezeptoren und zugehörigen MHC-Komplexe für CD8+ (zytotoxische) T-Zellen, CD4+ (Helfer-)T-Zellen. Besonderheiten der iNKT-Zellen sind zum einen der invariante T-Zellrezeptor und zum anderen die Antigenerkennung von Glykolipiden. Die Kombinationen aus α - und β -Ketten, sowie NK-Zellrezeptoren sind für humane und murine iNKT-Zellen dargestellt.

Die Antigenerkennung konventioneller T-Zellen erfolgt in Form von Peptiden, welche mittels Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: major histocompatibility

complex, MHC) -Proteinen präsentiert werden. iNKT-Zellen erkennen hingegen Glykolipide, welche über CD1d präsentiert werden. CD1d ist dem Peptid-präsentierenden MHC-I-Molekül strukturell ähnlich (Abb. 2). iNKT-Zellen erkennen sowohl endogene (Bsp.: Isoglobotriosylceramid) als auch exogene Liganden (Bsp.: Lipopolysaccharide der Zellwände gram-negativer Bakterien) [14]. Als exogenes Stimulans werden in der Forschung α -Galaktosylceramid (α -GalCer) oder strukturähnliche Analoga verwendet. iNKT-Zellen bilden ca. 0,1 % der T-Lymphozyten. Ihre Anzahl unterliegt interindividuell einer breiten Schwankung, mit Tendenz zur Abnahme im Alter [15-18]. Trotz ihrer geringen Anzahl besitzen iNKT-Zellen potente immunregulatorische Funktionen.

Der Entdeckung spezifischer, iNKT-Zell-aktivierender CD1d-Liganden [19] ermöglichte intensive Forschung zur Funktion dieser Zellen im Immunsystem. Es zeigte sich, dass das Verhalten von iNKT-Zellen stark dem der Zellen des angeborenen Immunsystems ähnelt. Das prägende funktionelle Merkmal von iNKT-Zellen ist die schnelle und massenhafte Ausschüttung von Zytokinen nach ihrer Aktivierung [20]. iNKT-Zellen synthetisieren hierbei klassische T_{H1} - und T_{H2} -Zytokine Interferon (IFN)- γ und IL-4, aber auch IL-2, Tumornekrosefaktoren (TNF), IL-5, IL-13 und Granulozyten-Monozyten-koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF). Hierdurch nehmen iNKT-Zellen Einfluss auf die Funktion anderer Immunakteure, beispielsweise T-Zellen. Abhängig von den sekretierten Zytokinen kann eine Immunantwort verstärkend oder supprimierend moduliert werden, weshalb iNKT-Zellen als dynamische Immunregulatoren begriffen werden. Auch direkt zellkontaktvermittelte Interaktionen via Fas-Ligand oder NKG2D sind beschrieben. Welche Faktoren die regulatorische Funktion beeinflussen, ist Gegenstand aktueller Fragestellungen. Mögliche Hypothesen sind hierbei: Die Existenz funktioneller Untergruppen von iNKT-Zellen [21], die Aktivierung durch verschiedene Liganden, eine Abhängigkeit vom Kontext aus Kosignalen oder dem Kontext der Liganden-Präsentation. Das unmittelbare Zytokinprofil von iNKT-Zellen nach TZR-Aktivierung scheint relativ konstant zu sein [14]. Modulierbar ist die längerfristige Zytokinproduktion von iNKT-Zellen, sowie die Zytokine und Polarisierung transaktivierter Zellen. Aktivierte

iNKT-Zellen nehmen *in vitro* Einfluss auf eine Vielzahl von Immunzellen wie dendritische Zellen (DZ), NK-Zellen, B- und T-Zellen [22].

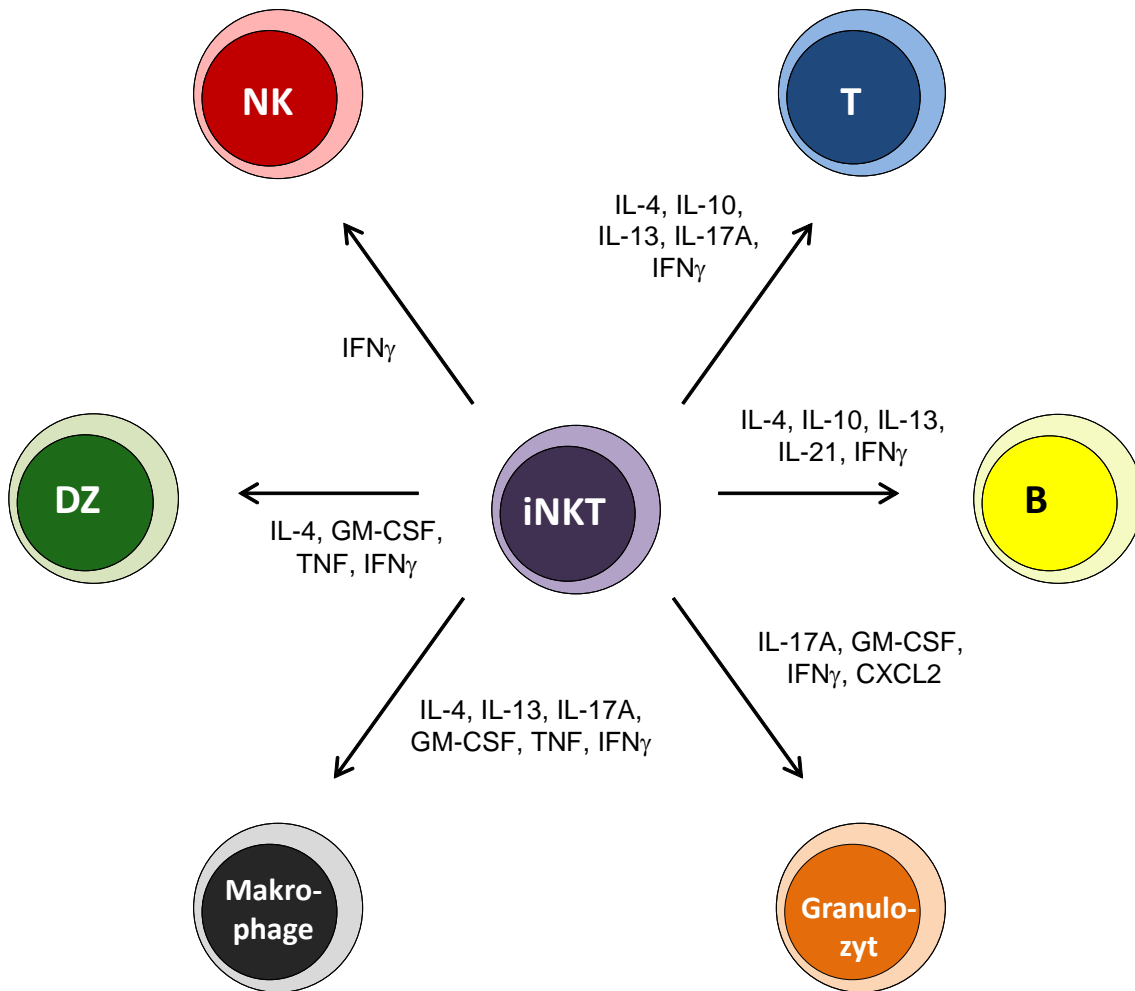


Abbildung 3: Interaktionen von iNKT-Zellen

iNKT-Zellen sind zentrale Immunakteure. Dargestellt sind die jeweiligen Zytokine, über welche iNKT-Zellen die Funktionen anderer Immunzellen beeinflussen. DZ: Dendritische Zelle, B: B-Lymphozyt, NK: NK-Zelle, T: T-Lymphozyt, GM-CSF: Granulozyten-Monozyten-Koloniestimulierender Faktor, CXCL2: Chemokin-CXC-Ligand 2. (verändert nach Brennan et al.; *Nature Reviews Immunology*. 2013. 13:S.111)

4.4 iNKT-Zellen und Autoimmunerkrankungen

Durch die Fähigkeit, nach Aktivierung schnell große Mengen an Zytokinen freizusetzen, besitzen iNKT-Zellen großes immunmodulatorisches Potential. Sie sind deshalb rasch in den Fokus von Forschungen zur Regulation von Immunantworten bei Infektionen, Tumorerkrankungen, Allergien und Autoimmunerkrankungen gerückt.

NOD (non-obese diabetic) ist ein Mausstamm, dessen Exemplare spontan an Diabetes mellitus Typ 1 erkranken und als verbreitetes Tiermodell für diese Erkrankung verwendet werden. Bei der Erkrankung führt die Zerstörung von Pankreaszellen durch autoreaktive T-Zellen zum Insulinmangel und der Entwicklung einer Diabeteserkrankung. Bei NOD-Mäusen gelang als erstes der Nachweis verminderter iNKT-Zahlen [23-25]. In Folgestudien konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Mäuse mit α -GalCer den Ausbruch der Krankheit verhinderte [26, 27]. Diese Erkenntnisse erweckten die Hypothese, dass iNKT-Zellen eine Rolle bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen zukommt und intensive Forschungen zu iNKT-Zellen und Autoimmunität begannen.

Tierexperimentell konnten Effekte auf die Entstehung verschiedener autoimmuner Modellerkrankungen nachgewiesen werden. So entwickeln beispielsweise iNKT-defiziente Mausstämme ein lupusähnliches Erkrankungsbild [28]. Bei anderen Erkrankungen liegen Hinweise für pathogenetische Funktionen der iNKT-Zellen vor, bspw. bei Asthma bronchiale [29]. Eine Vielzahl von tierexperimentellen Studien beschäftigt sich mit den Effekten der Stimulation von iNKT-Zellen auf autoimmune Phänomene. Im Falle der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), einer Modellerkrankung für Multiple Sklerose, konnte der Krankheitsausbruch durch Gabe eines iNKT-Zell-Liganden verhindert werden [30]. Bei NZB/W-Mäusen führt die Injektion von α -GalCer jedoch zur Exazerbation der bei diesem Mausstamm spontan entstehenden, lupusähnlichen Symptomatik [31].

4.5 Zielsetzung der Arbeit

Trotz ihrer geringen Anzahl nehmen iNKT-Zellen deutlichen Einfluss auf Immunreaktionen *in vivo* und *in vitro*. Die Dynamik der Beeinflussung, suppressiv oder fördernd, ist individuell abhängig vom Pathomechanismus der jeweiligen Erkrankung und dem Kontext der Immunreaktion. Die Erforschung von Rolle und Funktion von iNKT-Zellen bietet die Möglichkeit für ein umfassenderes Verständnis der Entstehung autoimmuner Erkrankungen und der Entwicklung potenzieller Therapieansätze.

Obwohl Indizien vorhanden sind, dass auch im Falle der SSc eine Beteiligung am Krankheitsgeschehen stattfindet [32, 33], ist die Studienlage zu iNKT-Zellen im Kontext der SSc bisher sehr begrenzt. Ein umfangreicheres Verständnis des zu Grunde liegenden Pathomechanismus ist zwingend nötig, um den Weg für effektivere Therapiemöglichkeiten zu ebnen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich deshalb mit der Frage, ob Hinweise auf eine Rolle der iNKT-Zellen beim Krankheitsgeschehen der SSc vorliegen. Es wurden Analysen zu Anzahl, Phänotyp und Funktion von iNKT-Zellen durchgeführt. Weiterhin wurde untersucht, ob Korrelationen zwischen Subtypen und Surrogatparametern der Krankheitsschwere und iNKT-Zellen bzw. ihren Merkmalen aufzeigbar sind.

5 Material und Methoden

5.1 Materialien

Tabelle 1: Reagenzien

Reagens	Abkürzung	Hersteller
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline	DPBS	gibco life technologies; Grand Island, USA
Bicoll Separating Solution (1,077 g/ml)		Biochrom; Berlin, Deutschland
Trypan Blue Solution (0,4 %)		Sigma-Aldrich; Steinheim, Deutschland
Fetal Bovine Serum	FBS	Biochrom; Berlin, Deutschland
Dimethyl Sulfoxide	DMSO	Sigma-Aldrich; Steinheim, Deutschland
RPMI Medium 1640 + GlutaMAX	RPMI	gibco life technologies; Grand Island, USA
2-Mercapto Ethanol	2-ME	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Minimum Essential Medium	MEM NEAA	gibco life technologies; Grand Island, USA
Natrium Pyruvat		gibco life technologies; Grand Island, USA
Penicillin/Streptomycin	PenStrep	Lonza; Verviers, Belgien
Hepes Buffer		gibco life technologies; Grand Island, USA
Ampuwa		Fresenius Kabi; Bad Homburg, Deutschland
Heparin-Natrium		Ratiopharm; Ulm, Deutschland
Tween 20 (Polysorbat)		Sigma-Aldrich; Steinheim, Deutschland

Tabelle 2: Stimulanzen

Stimulanzen	Konzentration	Hersteller
KRN7000 (α -GalCer)	100 ng/ml	Abcam; Berlin, Deutschland
hIL-2	100 IE/ml	Novartis; Nürnberg, Deutschland
Cell Stimulation Cocktail (plus protein transport inhibitors)	nach Herstellerangabe	eBioscience Thermo Fischer Scientific; Dreieich, Deutschland

Tabelle 3: Medien und Puffer

Medium	Zusammensetzung
Einfriermedium	RPMI 1640+Glutamax 20 % FBS 10 % DMSO
iNKT-Medium	RPMI 1640+Glutamax 10 % FBS 5,5 μ M 2-ME 0,1 mM MEM NEAA 1 mM Natrium-Pyruvate 100 IE PenStrep 10 mM HEPES
RPMI-Medium	RPMI 1640+Glutamax 10 % FBS
Puffer	Zusammensetzung
FCM-Puffer	DPBS 2 % FBS

Tabelle 4: Durchflusszytometrie-Reagenzien

Durchflusszytometrie-Reagenzien	Hersteller
FcR Blocking Reagent	Milteny Biotec; Bergisch Gladbach, Deutschland
One Comp Beads	eBioscience Thermo Fischer Scientific; Dreieich, Deutschland
Permeabilisation & Fixation Buffer Set	eBioscience Thermo Fischer Scientific; Dreieich, Deutschland

Tabelle 5: Antikörper für Durchflusszytometrie

Antikörper (human)	Fluorochrom	Klon	Hersteller
Lebend/Tot-Farbstoff	eFluor506		eBioscience Thermo Fischer Scientific; Dreieich, Deutschland
Cd1d-Tetramer	PE		Paul Savage, National Institutes of Health; Bethesda, USA
CD3	BV605	OKT3	BioLegend; Koblenz, Deutschland
CD3	PerCP-Cy5.5	OKT3	BioLegend; Koblenz, Deutschland
CD4	BV421	RPA-T4	BioLegend; Koblenz, Deutschland
CD8 α	FITC	HIT8a	BioLegend; Koblenz, Deutschland
CD19	APC-Cy7	SJ25C1	BioLegend; Koblenz, Deutschland
CD25 (IL2-R α)	BV711	BC96	BioLegend; Koblenz, Deutschland
CD45RA	BV650	HI100	BioLegend; Koblenz, Deutschland
CD127 (IL7-R α)	PE-Cy7	A019D5	BioLegend; Koblenz, Deutschland
CD197 (CCR7)	APC	G043H7	BioLegend; Koblenz, Deutschland
IFN γ	APC	4S.B3	eBioscience Thermo Fischer Scientific; Dreieich, Deutschland
IL-4	APC	8D4-8	BioLegend; Koblenz, Deutschland
IL-17R α	APC	A019D5	BioLegend; Koblenz, Deutschland

Tabelle 6: Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe	Vacusaft, Integra Biosciences; Bieberfeld, Deutschland
Brutschrank	MCO-18AIC, SANYO; Osaka, Japan
Durchlichtmikroskop	Axiovert 25, Zeiss; Jena, Deutschland
Durchflusszytometer	LSRFortessa Cell Analyzer, Becton Dickinson; Franklin Lakes, NJ, USA
Kühlschrank +4° C	BioCompact II, GRAM; Vojens, Dänemark
-20° C	Liebherr; Ochsenhausen, Deutschland
-80° C	Thermo Fischer Scientific; Schwerte, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Assistent, Sondheim vor der Rhön, Deutschland
Pipetteboy	Accu-jet pro, Brand, Wertheim, Deutschland
Pipetten	Transferpette, HandyStep; Brand, Wertheim, Deutschland
Sterilbank	LaminAir HBB 2448, Hareus; Hanau, Deutschland
Stickstofftank	Chronos 420, Cryotherm; Kirchen, Deutschland
Tisch-Zentrifuge	D-6020, neoLab; Heidelberg, Deutschland
Vortexer	D-6012, neoLab; Heidelberg, Deutschland
Wasserbad	Typ 1083, GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH; Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge	Multifuge 3S-R, Kendro; Osterode, Deutschland
Sterilbank	Heraeus; Hanau, Deutschland

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One; Frickenhausen, Deutschland
Einmalspritzen	Braun; Wertheim, Deutschland
FCM-Röhrchen	Falcon, Corning Incorporated; Corning, New York, USA
Pipettenspitzen	Biosphere; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
	TipOne, Starlap; Milton Keynes, Großbritannien
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Zellkulturplatten (24 well)	costar, Corning Incorporated; Corning, New York, USA
Zentrifugen-Röhrchen (15 ml; 50 ml)	CELLSTAR, greiner bio-one; Frickenhausen, Deutschland

5.2 Methoden

5.2.1 Akquise von Patientenblutproben

Die vorliegende Studie wurde von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät Tübingen geprüft und genehmigt (Votum 114/2016BO2). Alle Studienteilnehmer haben nach sorgfältiger Aufklärung ihre schriftliche Einwilligung zur Studie erklärt. Im Rahmen der Systemsklerose-Sprechstunde der rheumatologischen Ambulanz der Universitätsklinik Tübingen wurden Blutproben von 88 konsekutiven Patienten mit Systemischer Sklerose

entnommen. Die Entnahme von 50 ml peripherem Blut unter Zumischung von Heparin-Natrium (200 I.E./ml) erfolgte im Zuge der Blutentnahme für das Routinelabor. Die zum selben Termin erhobenen klinischen Untersuchungs- und Laborergebnisse wurden für die Datenanalyse herangezogen. Als gesunde Kontrollen dienten sogenannte BuffyCoats. Hierbei handelt es sich um ein Nebenprodukt der Herstellung von Erythrozyten-Konzentraten aus Vollblutspenden, welches die kernhaltigen Blutzellen des Spenders in hoher Konzentration beinhaltet. Die BuffyCoats wurden über das Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Tübingen bezogen.

5.2.2 Isolierung, Kryokonservierung & Auftauen von PBMC

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl.: peripheral blood mononuclear cells, PBMC) wurden mit Hilfe von Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert. Hierbei wird eine Ficoll-Trennlösung mit Dichte 1,077 g/ml verwendet. Bei der Zentrifugation treten schwerere Blutbestandteile wie Erythrozyten und Granulozyten durch diese hindurch, während Lymphozyten und Monozyten eine Interphase zwischen Ficoll und Plasma der Blutprobe bilden und isoliert werden können. Es wurden 15 ml Ficoll-Lösung in einem 50 ml Falcon vorsichtig mit verdünntem Blut überschichtet (25 ml Blut + 10ml DPBS) und zentrifugiert (20 min; 800g). Nach vorsichtigem Abnehmen der Interphase wurden die Zellen in zwei Waschschritten gereinigt (5 min; 450 g) und von Thrombozyten (10 min; 125 g) befreit. Anschließend erfolgte die Zählung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter Ausschluss toter Zellen mittels Trypanblau-Färbung (0,04 %). Die PBMC wurden in Einfriermedium (10 % DMSO, 20 % FBS) aufgenommen, zügig in Kryo-Röhrchen aliquotiert und bei -80° C für ein bis zwei Tage gelagert. Danach wurden die Zellen in Stickstofflagerung bei -257° C überführt.

Das Auftauprotokoll beinhaltete die rasche Überführung der kryokonservierten Probenröhrchen in ein 37° C warmes Wasserbad. Nach einer Minute erfolgte die Aufnahme in 50 ml DPBS und das Abzentrifugieren des verdünnten Einfriermediums.

5.2.3 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Detektion von Zielmolekülen auf oder in Zellen mittels Fluoreszenzeffekten. Hierbei werden Zellstrukturen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen gewünschte Zielantigene markiert. Innerhalb einer Mikrokanalküvette werden die Zellen in Flüssigkeit einzeln an einem Laserstrahl definierter Wellenlänge vorbeigeleitet, welcher zur spezifischen Anregung des Fluorochroms dient. Die Emission des fluorochromspezifischen Wellenspektrums wird über Filtersysteme und Photomultiplier erfasst. Durch Kombination verschiedener Laser zur Anregung und verschiedener Fluorochrome mit unterschiedlichen Emissionsspektren ist es möglich, simultan mehrere Antigene auf Einzelzellen zu erfassen. Mit modernen Geräten können so in kurzer Zeit große Zellpopulationen hinsichtlich ihrer Merkmalausstattung detailliert charakterisiert werden.

5.2.4 Extrazelluläre Färbung

In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie zur Immunphänotypisierung von Lymphozyten verwendet. Für die extrazelluläre Färbung wurden bis zu 2×10^7 PBMC vorgelegt und zunächst in 50 μ l FCM-Puffer mit F_c -Rezeptor-Blocker inkubiert (5 min; 4° C), um unspezifische Bindungen zwischen zellulärem F_c -Rezeptor und F_c -Teil der verwendeten Antikörper zu unterbinden. Danach erfolgte die Inkubation mit Antikörpern des gewünschten Färbeprotokolls in weiteren 50 μ l FCM-Puffer (20 min, 4° C). Die jeweiligen Antikörper wurden in optimierter Konzentration anhand laboreigener Titrationsversuche verwendet. Nach Inkubation erfolgte die Zentrifugation der Probenröhrchen und anschließende Abnahme des Überstandes zur Entfernung ungebundener Antikörper. Die Zellen wurden anschließend in FCM-Puffer resuspendiert, gekühlt und im Dunkeln gelagert. Patientenproben und gesunde Kontrollen wurden mit einem Färbeprotokoll aus immunologischen Oberflächenmarkern analysiert, welches folgende Antigene erfasste: CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD45RA, CD127, CD197, CD1d-Tetramer. Zusätzlich wurden tote Zellen mittels ihrer Aufnahme von eFluor506 gefärbt und bei der Analyse exkludiert. Die Messung der Proben erfolgte zeitnah nach der Färbung an einem LSR Fortessa von BD Biosciences.

5.2.5 Intrazelluläre Färbung

Für die Messung intrazellulärer Moleküle wurden die Zellen nach dem extrazellulären Färbeschritt fixiert und permeabilisiert. Dies erfolgte durch Inkubation mit 100 µl Fixations-Puffer im Dunkeln (30 min; Raumtemperatur) und Zugabe von 1 ml Permeabilisations-Puffer mit anschließendem Waschen (5 min, 450 g). Die Zellen wurden dann analog zum oben genannten Färbeprotokoll mit Anti-Zytokin-Antikörpern behandelt. Dieser Schritt ermöglicht die intrazelluläre Bindung der Antikörper über die permeabilisierte Zellmembran hinweg. Der extrazelluläre Färbeschritt beinhaltete die Marker CD3, CD4, CD8, CD1d-Tetramer und eFluor506. Beim intrazellulären Färbeschritt wurden CD3, CD4, CD8 sowie entweder IFN γ , IL-4 oder IL-17 verwendet. Die Messung erfolgte zeitnah an einem Fortessa LSR.

5.2.6 Zellkultur zur Zytokinmessung

Zur Analyse von Zytokinen bei iNKT- und T-Zellen wurden aufgetaute PBMC von gesunden Kontrollen und SSc-Patienten in Zellkultur mit einem Stimulationscocktail (eBioscience) zur Zytokinproduktion angeregt. Hierbei wurden 2×10^6 PBMC in 1 ml Kulturmedium suspendiert und mit einem Stimulationscocktail aus Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und Ionomycin (2 µl/ml) für 4 Stunden (37,5° C, 20 % CO $_2$) inkubiert. Eine Behandlung mit PMA und Ionomycin reicht aus, um die Aktivierung vieler Zellarten für die Produktion von Zytokinen einzuleiten. Die Kultur wurde in Verbindung mit einem Protein Transport Inhibitor Cocktail (eBiosciences) für die intrazelluläre Retention der eingeleiteten Zytokin-Expression angesetzt.

5.2.7 Zellkultur mit α -GalCer

Die Analyse des Expansionspotentials von iNKT-Zellen erfolgte mit frisch isolierten, nicht kryokonservierten PBMC von Gesunden und Erkrankten. 2×10^6 PBMC wurden in 1 ml Kulturmedium mit 100 ng/ml α -GalCer und 100 IE/ml rekombinatem humanen IL-2 (rhIL-2) versetzt und 7 Tage inkubiert (37,5° C, 20 % CO $_2$). Vor Kultur und an Tag 7 erfolgte die durchflusszytometrische Quantifizierung der iNKT-Zellen. Die Marker CD3, CD4, CD8, CD1d-Tetramer wurden erfasst, tote Zellen über eFluor506 exkludiert. Zusätzlich wurden

absolute Zellzahlen erfasst, die Zählung erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer, wie oben beschrieben.

5.2.8 Datenanalyse

Die Analyse der Messdaten wurde mit der Software FlowJo V10 durchgeführt. Bei allen Proben wurde auf homogenen Fluss im Messzeitraum geachtet und eine einheitliche Gating-Strategie angewandt. Zellpopulationen mit gradueller Antigen-Expression (CD25, IFN γ , IL-4, IL-17) wurden anhand der *Fluorescence-Minus-One*(FMO)-Methode in positive und negative Populationen getrennt. Hierbei wird ein Teil der zu messenden Zellen separat mit einem Messprotokoll gefärbt, welches bis auf das Fehlen des fraglichen Fluorochrom-AK identisch mit der vollgefärbten Probe ist. Anhand der Fluoreszenz der ungefärbten Zellpopulation wird eine Schwelle für die Fluoreszenz-Intensität erstellt, welche von 1 % der ungefärbten Zellen überschritten wird. Alle Zellen der vollgefärbten Probe mit höherer Fluoreszenz im fraglichen Kanal werden als positiv bewertet.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit GraphPad Prism 7.03 Software. Normalverteilte Daten wurden mit t-Tests nach Student, nicht-normalverteilte mit Mann-Whitney-U-Tests analysiert. Unterschiede unterhalb eines Signifikanzniveaus von 5 % wurden als signifikant bewertet. In Abbildungen sind p-Werte wie folgt gekennzeichnet: * <0,05; ** <0,01; *** <0,001; ****<0,0001. Korrelationen werden mittels Determinationskoeffizient R² beschrieben.

6 Ergebnisse

6.1 Deskriptive Analyse der Studienpopulation

6.1.1 Epidemiologische und klinische Charakterisierung

Erfasst wurden insgesamt 88 konsekutive Patienten im Zeitraum von Mai 2016 bis Dezember 2017, davon waren 75 % weiblichen und 25 % männlichen Geschlechts. Das mittlere Alter betrug 53 Jahre, mit einer Spanne von 22 bis 88 Jahren und einer Standardabweichung von ± 14 Jahren. 65 % der Erkrankten litten an limitiert-kutaner Sklerodermie, 35 % an der diffus-kutanen Verlaufsform. Bei 44 % der Patienten konnte der prognostische Autoantikörper Scl-70 nachgewiesen werden. Die mittlere Erkrankungsdauer betrug 8 Jahre mit einer Spanne von 0 bis 40 Jahren und einer Standardabweichung von ± 14 Jahren. Die mittlere Schwere der Hautsklerose, erhoben anhand eines für SSc standardisierten klinischen Tests, dem modifizierter Rodnan-Skin-Scores (mRSS), betrug 8 Punkte mit Standardabweichung ± 8 , einem Maximum von 44 Punkten und 11 Patienten mit 0 Punkten, also ohne klinisch manifeste Hautbeteiligung. Weitere klinische Parameter sind in Tabelle 5 aufgeführt.

6.1.2 Immunsuppression

Zum Zeitpunkt der Erhebung nahmen 58 % der Patienten immunsupprimierende Medikamente ein. Hierbei kamen Mycophenolsäure (n =23), Methotrexat (n =10) und weitere Substanzen zum Einsatz (siehe Tab. 5). Im Rahmen der Interpretation der Ergebnisse ist dies von Bedeutung, da die Zielstrukturen dieser Therapeutika die Zellen des Immunsystems sind und ein Einfluss auf die erhobenen Messergebnisse denkbar ist. Bei 42 % der Patienten lag zum Untersuchungszeitpunkt keine immunsuppressive Therapie vor. Für alle folgenden Betrachtungen wurde untersucht, ob eine bestehende Immunsuppression einen Störfaktor darstellt.

Tabelle 8: Studienkollektiv

n = 88	
Alter—Jahre	
Median	53
Spannweite	22-88
Geschlecht—Anzahl (%)	
weiblich	66 (75)
männlich	22 (25)
SSc Subtyp—Anzahl (%)	
limitiert-kutan	57 (65)
diffus-kutan	31 (35)
Krankheitsdauer—Jahre	
Median	8
Spannweite	0-40
Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG)—mm/h	
Mittelwert	14
Spannweite	0-94
C-reaktives Protein (CRP)—mg/dl	
Mittelwert	0,4
Spannweite	0,01-2,52
γ-Globuline im Serum—%	
Mittelwert	16
Spannweite	9,4-38,3
Autoantikörper—Anzahl (%)	
Antinukleäre AK (ANA)	82 (93)
Anti-Scl-70	39 (44)
Anti-Zentromer-AK	24 (27)
Modifizierter Rodnan Skin Score (mRSS)	
Mittelwert	8
Spannweite	0-44
Vorbehandlung—Anzahl (%)	
Cyclophosphamid	23 (26)
Rituximab	2 (2)
autologe Stammzelltransplantation	6 (7)
Immunsuppressive Therapie bei Blutentnahme—Anzahl (%)	
keine	37 (42)
Prednisolon	6 (7)
Cyclophosphamid	5 (6)
Mycophenolat	23 (26)
Azathioprin	5 (6)
Methotrexat	10 (11)
andere	3 (3)

nach: Pecher, Kettmann. *Arthritis Research & Therapy*. 2019 21:212.[34]

6.2 Immunphänotypisierung durch Analyse von Oberflächenantigenen

6.2.1 Quantifizierung von Lymphozytenpopulationen

Die moderne Durchflusszytometrie erlaubt die simultane Erhebung einer Vielzahl von Oberflächenmarkern. Dies ermöglicht die zeitgleiche Phänotypisierung mehrerer Lymphozytenpopulationen. Im Rahmen unserer Untersuchung nutzten wir eine laboreigene Palette von Zielantigenen um iNKT-Zellen und andere Lymphozyten durchflusszytometrisch zu analysieren. Abbildung 4 zeigt die Gating-Strategie zur Identifizierung der unterschiedlichen Populationen.

Um Hinweise auf eine Beteiligung von iNKT-Zellen am Krankheitsgeschehen der SSc zu klären, untersuchten wir zunächst die Frage, ob numerische Unterschiede der Lymphozytenpopulationen im Vergleich mit Gesunden vorhanden sind. Die Lymphozytenproben der Studienpopulation wurden hierzu mit denen gesunder Kontrollen verglichen. Der Vergleich des Anteils von iNKT-Zellen an den Lymphozyten zeigt für Gesunde im Mittel 0,16 %, für SSc-Patienten nur 0,03 % (Abb. 5A). Unter Einbezug der im Labor gemessenen Gesamtlymphozytenzahl im peripheren Blut der Probanden ergibt sich für Gesunde im Mittel eine errechnete Konzentration von 2840, für SSc-Patienten 518 iNKT-Zellen pro Milliliter Blut (Abb. 5B). Beide Unterschiede sind statistisch signifikant mit $p < 0,0001$. Unsere Untersuchung bestätigte damit sowohl eine relativ zur gesamten T-Lymphozytenzahl bestehende, als auch absolute Reduktion von iNKT-Zellen im peripheren Blut SSc-Erkrankter. Die Annahme, dass es sich um einen spezifisch iNKT-Zellen betreffenden Prozess handelt, wird durch die Beobachtung gefestigt, dass andere Lymphozytenpopulationen (i.e. T- und B-Lymphozyten, regulatorische T-Zellen, siehe Abb. 5C-D) in vergleichbarer Anzahl bei Gesunden und bei an SSc Erkrankten gemessen wurden.

Konventionelle T-Lymphozyten werden anhand der Korezeptoren CD4 und CD8 in T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen unterschieden. Bei SSc-Erkrankten zeigten sich im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe vermehrt T-Helferzellen, der Anteil zytotoxischer T-Lymphozyten zeigte sich reduziert (Abb. 5E).

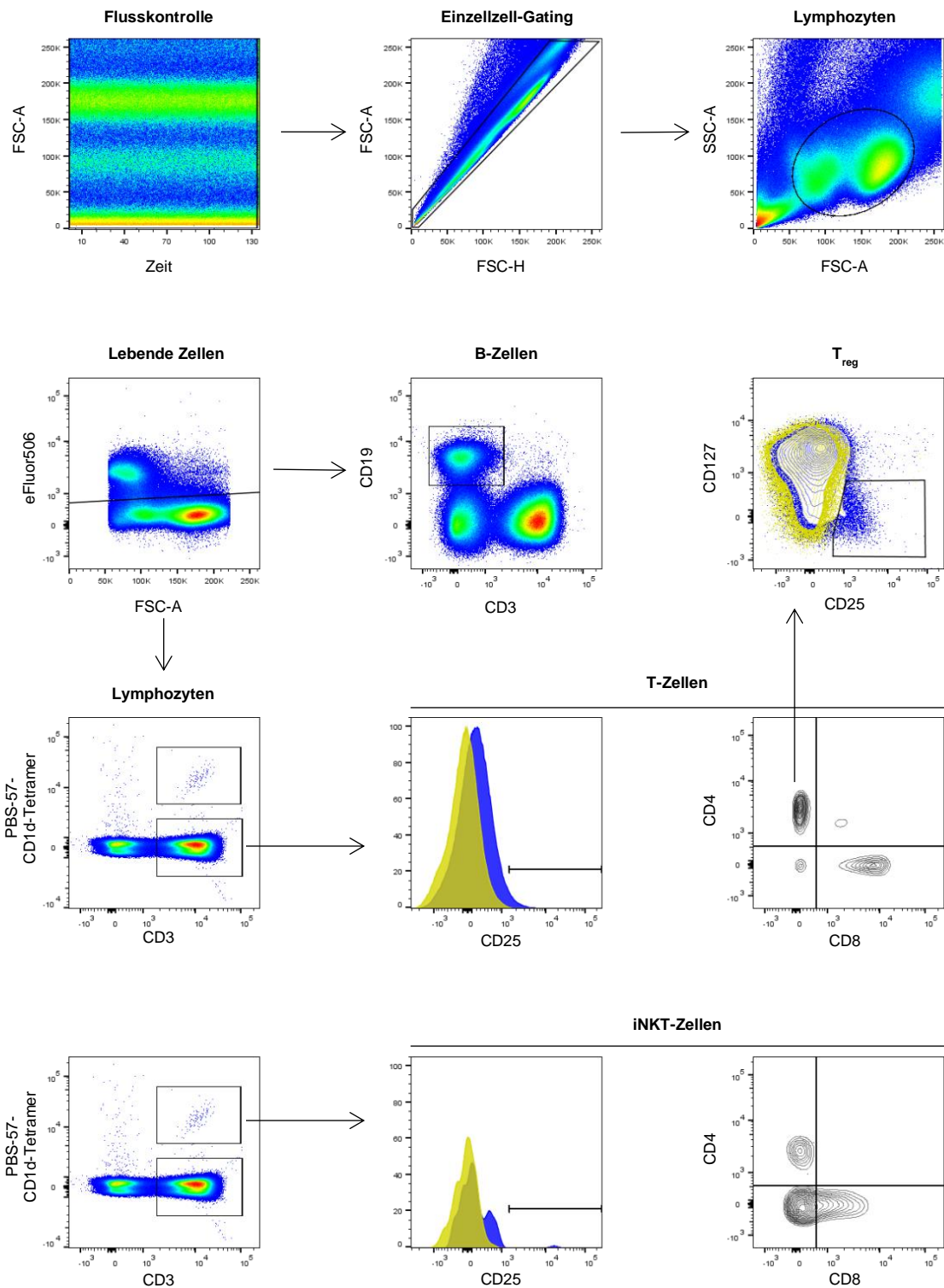


Abbildung 4: Durchflusszytometrische Analyse von PBMC

Beispielhafte Darstellung einer durchflusszytometrischen Analyse. Gezeigt ist die Gating-Strategie zur Identifikation verschiedener Immunzellpopulationen, hier an PBMC eines gesunden Probanden. Zunächst wurde die homogene Zellakquise überprüft, Zelldoubletten exkludiert und Lymphozyten anhand typischer Zellgröße und Granularität selektiert (obere Zeile). Es folgte die Exklusion nicht-vitaler Lymphozyten über deren Aufnahme von eFluor506. Unter den

Lymphozyten wurden B-Lymphozyten mittels ihrer Expression von CD19 identifiziert, T-Lymphozyten mittels CD3. T-Lymphozyten wurden weiter in die Subtypen iNKT-Zellen (Tetramer-positiv) und konventionelle T-Zellen unterschieden (Tetramer-negativ). Anschließend wurden beide Populationen auf die Expression von CD25 und CD4/CD8 untersucht. In den überlappenden Diagrammen für CD25 zeigen gelbe Flächen die Werte der FMO-Kontrolle, blaue Flächen die der Komplettfärbung. T_{reg} wurden durch den Phänotyp CD3⁺CD4⁺CD127^{high}CD25^{low} identifiziert. Die Analyse erfolgte standardisiert nach diesem Schema für Patienten und Gesunde. FSC-A: Forward-Scatter-Area. FSC-H: Forward-Scatter-Height. SSC-A: Sideward-Scatter-Area. T_{reg}: regulatorische T-Zellen.

nach: Pecher, Kettemann. Arthritis Research & Therapy. 2019 21:212.[34]

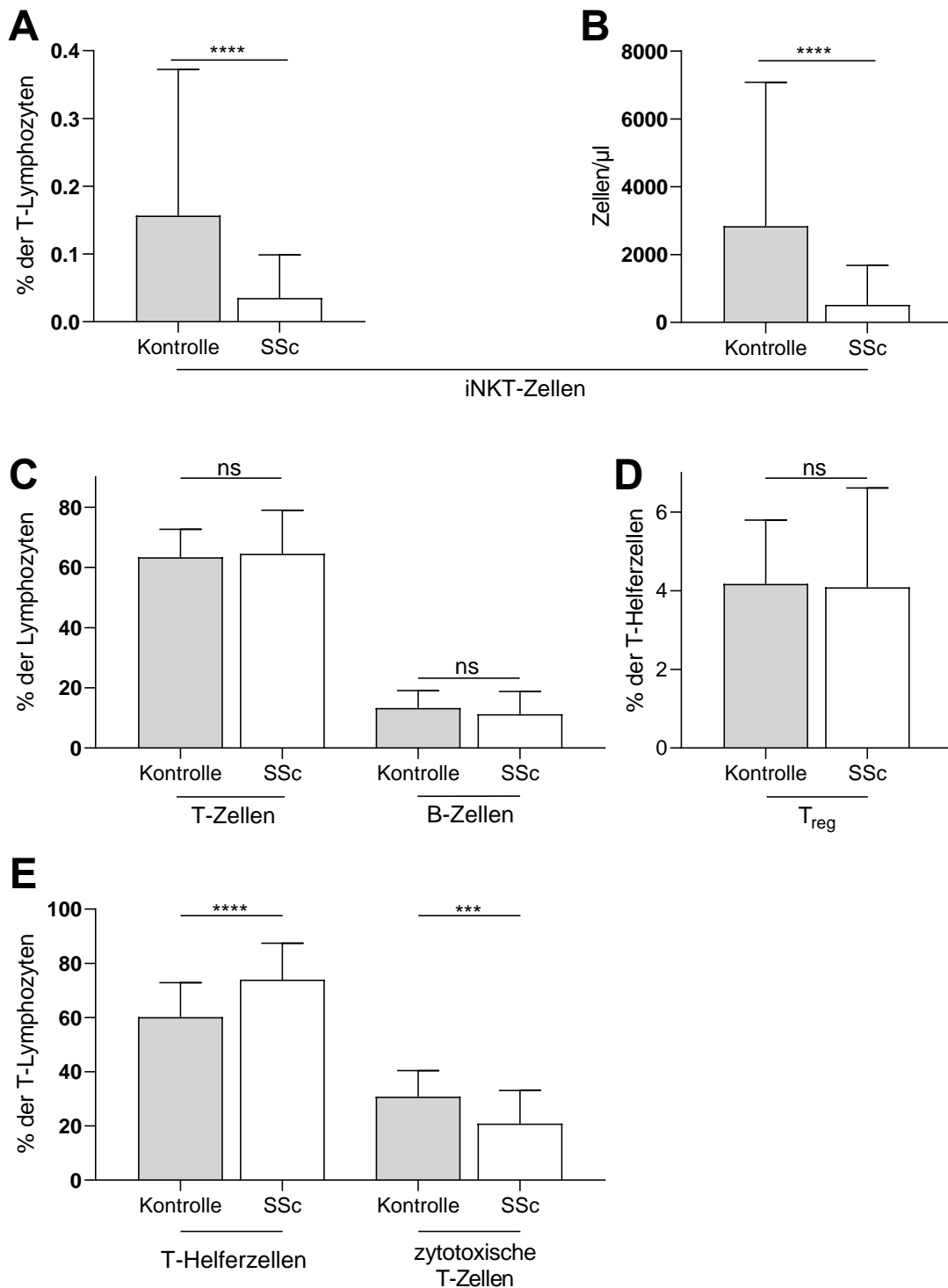


Abbildung 5: Reduzierte iNKT-Zellzahlen und vermehrt T-Helferzellen bei SSc-Erkrankten.

Gezeigt sind die durchflusszytometrisch gemessenen Häufigkeiten verschiedener Lymphozytenpopulationen für SSc-Erkrankte und Gesunde im Vergleich. Für iNKT-Zellen sind die relativen Anteile an den Lymphozyten (A), sowie die errechnete Zellkonzentration im peripheren Blut (B) dargestellt. Weiterhin wurden die Häufigkeiten von T- und B-Lymphozyten (C), regulatorischen T-Zellen (D), sowie T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen (E) verglichen. SSc-Erkrankte haben im Vergleich zu Gesunden deutlich reduzierte iNKT-Zellzahlen im peripheren Blut. Unter

konventionellen T-Lymphozyten zeigen sich erhöhte T-Helferzellen und reduzierte zytotoxische T-Lymphozyten. Andere Lymphozytenpopulationen scheinen sich in Häufigkeit nicht von Gesunden zu unterscheiden. Gesunde Kontrollen n =33, SSc n= 88. ns: nicht signifikant. SSc: Systemische Sklerose. Balken zeigen Mittelwerte, Antennen die Standardabweichung.

nach: Pecher, Kettmann. *Arthritis Research & Therapy*. 2019 21:212.[34]

6.2.2 Charakterisierung der iNKT-Zellpopulation

iNKT-Zellen können anhand der Expression eines der beiden Korezeptoren CD4, CD8 oder dem Fehlen von beiden unterteilt werden. Diese Subpopulationen erfüllen distinkte Aufgaben im immunregulatorischen Netzwerk. Wir stellten uns deshalb die Frage, ob numerische Unterschiede bei SSc Erkrankten auch in Bezug auf Subpopulationen nachweisbar sind. Dies würde Hinweise liefern, ob einerseits das Fehlen einer bestimmten Subpopulation für das Krankheitsgeschehen Relevanz besitzt und andererseits Rückschlüsse auf die Funktion einer Subgruppe ermöglichen. Für iNKT-Zellen zeigte sich im Vergleich zu Gesunden keine signifikante Dominanz oder Dekreszenz einer bestimmten Subpopulation (Abb. 6A). Im Zuge autoimmuner Prozesse werden Lymphozyten im Körper durch spezifische Signale aktiviert und gehen vom Ruhezustand in einen Aktiven über. Diese Zellaktivierung ist anhand der veränderten Expression des Rezeptors für IL-2 (CD25) messbar. Der Vergleich des Aktivitätsniveaus von iNKT-Zellen bei SSc anhand der Fluoreszenzintensität für CD25 erbrachte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur gesunden Kontrolle (Abb. 6B).

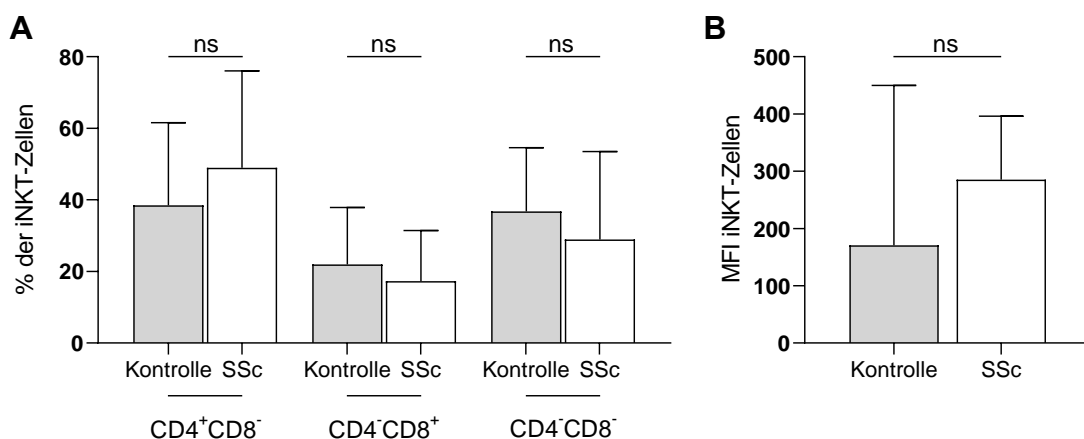


Abbildung 6: Qualitative Merkmale der iNKT-Zellen zeigten sich bei SSc im Vergleich zu Gesunden nicht verändert.

Durchflusszytometrisch wurden Subpopulationen und Aktivitätsstatus von iNKT-Zellen bei Gesunden und SSc-Erkrankten erhoben und verglichen, wobei keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten. **A** Subgruppen von iNKT-Zellen, gebildet durch Expression von CD4, CD8 oder keinem der beiden Korezeptoren. Gesunde Kontrollen n =33, SSc n =87. Balken zeigen Mittelwerte, Antennen die Standardabweichung. **B** Aktivitätsstatus der iNKT-Zellen, bestimmt anhand der Fluoreszenzintensität des Aktivitätsmarkers CD25. Gesunde Kontrollen n =22, SSc n =78. ns: nicht signifikant. MFI: mediane Fluoreszenzintensität. SSc: Systemische Sklerose. Balken zeigen Mediane, Antennen die die 75. Perzentilen.

nach: Pecher, Kettemann. *Arthritis Research & Therapy*. 2019 21:212.[34]

6.3 Funktionelle Untersuchungen an iNKT- und T-Zellen

6.3.1 Intrazelluläre Zytokinproduktion nach *in vitro* Stimulation

Um immunologische Prozesse zu charakterisieren ist außer der Anzahl von Immunzellen auch eine qualitative Analyse von Bedeutung. iNKT-Zellen sind potente Immunregulatoren, die trotz physiologisch niedriger Anzahl Immunreaktionen beeinflussen können. iNKT-Zellen sind fähig, nach Aktivierung innerhalb kurzer Zeit große Mengen an Zytokinen zu produzieren und dadurch die Differenzierung von T-Helferzellen in verschiedene Phänotypen wie T_{H1}-, T_{H2}- oder T_{H17}-polarisierte T-Zellen zu beeinflussen. Nachdem die Zellen zuvor *in vitro* zur Zytokinproduktion angeregt wurden, untersuchten wir durch intrazelluläre Anfärbung der jeweiligen Schlüsselzytokine das Zytokinprofil der iNKT- und T-Helferzellen bei SSc-Erkrankten. Die Analyse zeigte einen erhöhten Anteil IL-17-produzierender iNKT-Zellen; IFN γ und IL-4 waren im Vergleich mit Gesunden nicht signifikant verändert (Abb. 7).

Bei T-Helferzellen zeigte sich eine signifikante Erhöhung der IL-17-produzierenden Zellen, während die IL-4 Produktion stark eingeschränkt war. Die Anzahl IFN γ -produzierender Zellen entsprach der von Gesunden (Abb. 8A-C). Die Analyse nach Aufteilung in Gruppen mit und ohne Immunsuppression erbrachte für IFN γ und IL-4 keine signifikanten Unterschiede. Die Anzahl IL-17-produzierender T-Helferzellen zeigte sich jedoch nur erhöht bei SSc-Patienten, welche keine immunsupprimierenden Medikamente einnahmen. Unter immunsuppressiver Therapie zeigte sich die Anzahl IL-17-produzierender Zellen auf einem Niveau ohne signifikanten Unterschied zu Gesunden (Abb. 8D-E).

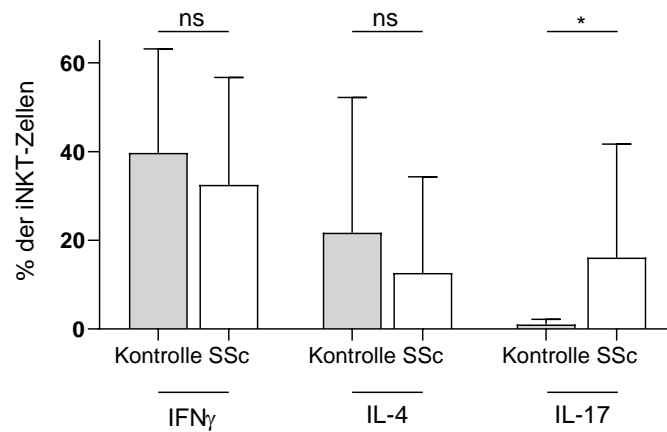


Abbildung 7: Verstärkte IL-17 Produktion durch iNKT-Zellen bei SSc-Erkrankten nach *in vitro* Stimulation

Nach *in vitro* Stimulation von PBMC wurde die intrazelluläre Produktion von Zytokinen durch iNKT-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. iNKT-Zellen von SSc-Erkrankten zeigten eine signifikant erhöhte Bereitschaft zur Produktion von IL-17. Gesunde Kontrollen n =14, SSc n=21. ns: nicht signifikant. SSc: Systemische Sklerose. SD: Standardabweichung. IFN: Interferon. IL: Interleukin. Balken zeigen Mittelwerte, Antennen die Standardabweichung.

nach: Pecher, Kettmann. *Arthritis Research & Therapy*. 2019 21:212.[34]

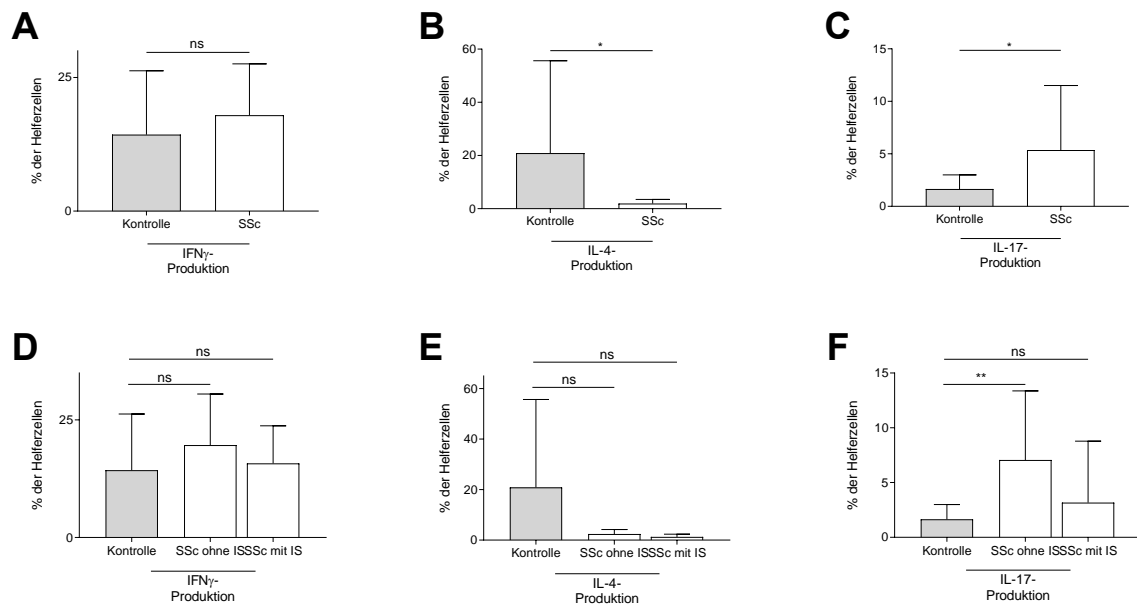


Abbildung 8: T-Helferzellen von SSc-Patienten bilden verstärkt IL-17 und seltener IL-4

Nach *in vitro* Stimulation von PBMC wurde die intrazelluläre Zytokinproduktion von T-Zellen untersucht (A-C). Diese zeigten sich bei SSc-Patienten verstärkt positiv für IL-17 und seltener positiv für IL-4. Weiterhin wurde das Studienkollektiv in Patienten mit und ohne Immunsuppression unterteilt (D-F), wobei sich zeigte, dass der Effekt für IL-17 von T-Zellen von Patienten ohne Immunsuppression ausging. Gesunde Kontrollen n =13, SSc n =16, davon SSc ohne IS n =9 und SSc mit IS n =7. IS: Immunsuppression. SD: Standardabweichung. IFN: Interferon. IL: Interleukin. Balken zeigen Mittelwerte, Antennen die Standardabweichung.

nach: Pecher, Kettmann. *Arthritis Research & Therapy*. 2019 21:212.[34]

6.3.2 Expansionsverhalten von iNKT-Zellen nach *in vitro* Stimulation

Die Stimulation über einen Liganden des CD1d-Rezeptors führt physiologisch zu einer starken Proliferation von iNKT-Zellen. Um das Verhalten von iNKT-Zellen bei SSc genauer zu beurteilen, untersuchten wir iNKT-Zellen in Kulturansätzen nach Stimulation mit dem aktivierenden Liganden α -GalCer. Dieses Experiment erlaubt Rückschlüsse über die Expansionsfähigkeit der Zellen *in vitro* und damit über ihre funktionelle Kompetenz. Wir analysierten iNKT-Zellzahlen in Kulturen frischer PBMC von Gesunden und SSc-Patienten vor und sieben Tage nach Stimulation. Es zeigte sich, dass gesunde iNKT-Zellen um ein Vielfaches stärker proliferieren als iNKT-Zellen von SSc-Patienten (Abb. 9). Dies weist darauf hin, dass in der Tat ein funktioneller Defekt von iNKT-Zellen bei SSc vorliegt.

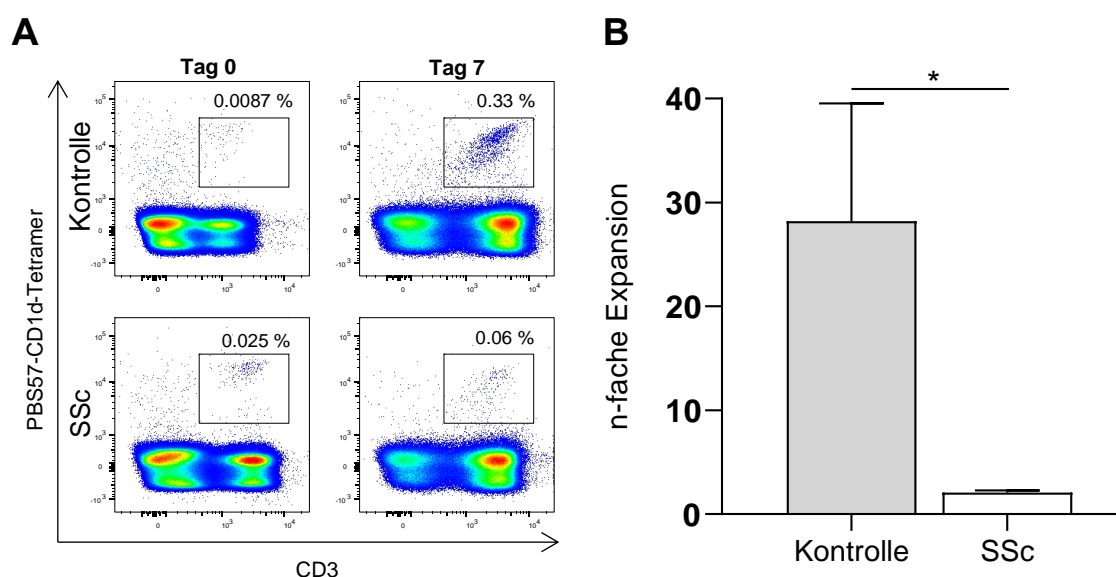


Abbildung 9: Defizitäre Expansion von iNKT-Zellen bei SSc

Nach *in vitro* Stimulation von PBMC mit dem spezifischen iNKT-Zell-Liganden α -GalCer und IL-2 wurde die Expansion des iNKT-Zellpools über 7 Tage bestimmt. iNKT-Zellen gesunder Kontrollen proliferierten um ein Vielfaches stärker als die von SSc-Patienten. **A** Beispielhafte durchflusszytometrische Erfassung von iNKT-Zellen bei Gesunden und an SSc Erkrankten, vor (Tag 0) und 7 Tage nach Stimulation (Tag 7). iNKT-Zellen wurden durch die Expression von CD3 und der Bindung des mit PBS57 beladenen CD1d-Tetramers identifiziert. **B** n-fache Expansion der iNKT-Zellen über 7 Tage im Vergleich zum Ausgangswert. Gesunde Kontrollen n=4. SSc: Systemische Sklerose. Balken zeigen den Mittelwert, Antennen die Standardabweichung.

nach: Pecher, Kettmann. *Arthritis Research & Therapy*. 2019 21:212.[34]

6.4 Untersuchungen zu Krankheitsaktivität und iNKT-Zellzahl

6.4.1 Gruppierung nach Surrogatparametern der Krankheitsschwere

Falls iNKT-Zellen eine Rolle beim Krankheitsgeschehen der SSc spielten, wäre es naheliegend, dass eine ausgeprägtere Veränderung der iNKT-Zellzahl mit schwereren Verläufen der Erkrankung einherginge. Wir untersuchten deshalb Korrelationen verschiedener Surrogatparameter für die Schwere der Erkrankung zur Anzahl an iNKT-Zellen. Naheliegend war hierbei zunächst die Gruppierung nach Krankheitsverlauf: limitiert- oder diffus-kutan. Neben einer disseminierten Beteiligung der Haut geht letztgenannter mit einer schlechteren Prognose durch häufigeren Organbefall einher. Unterschiede im Auftreten von iNKT-Zellen hätten so Anhaltspunkte für eine protektive Rolle von iNKT-Zellen in Bezug auf viszerale Körperkompartimente gegeben. Bei der Stratifikation nach Krankheitsverlauf zeigten sich jedoch keine Unterschiede der Anzahl an iNKT-Zellen (Abb. 10A). Denkbar wäre weiterhin, dass iNKT-Zellen über regulatorische Interaktion mit B-Lymphozyten Einfluss auf die Bildung von Autoantikörpern nehmen. Betrachtet man die Anzahl an iNKT-Zellen bei Patienten mit und ohne Autoantikörper, findet man jedoch ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (Abb. 10B). Auch die Notwendigkeit immunsuppressiver Therapie kann als Marker für die Aktivität der Erkrankung betrachtet werden und wurde von uns untersucht. Die Einnahme immunsupprimierender Medikamente scheint jedoch keinen Einfluss auf die Höhe der iNKT-Zellzahl zu haben. Die Mittelwerte von iNKT-Zellen zeigten sich statistisch nicht signifikant divergent, wenn SSc-Patienten nach Immunsuppression gruppiert wurden (Abb. 10C).

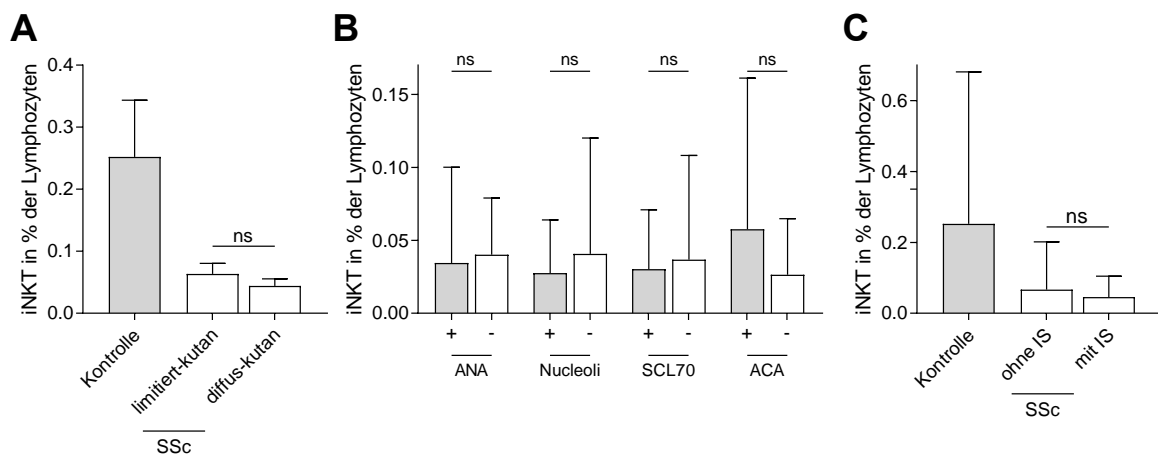


Abbildung 10: iNKT-Zellzahlen haben keine direkten Auswirkungen auf klinische Parameter

SSc Patienten wurden nach verschiedenen klinischen Parametern gruppiert und die iNKT-Zellzahlen der Gruppen untersucht, um mögliche direkte Auswirkungen von Zellzahl auf Krankheitsaktivität aufzuzeigen. Für klinische Subgruppen, Autoantikörper und die Einnahme immunsupprimierender Medikamente zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. **A** iNKT-Zellzahl gruppiert nach klinischer Subgruppe: Gesunde Kontrollen n=22, limitiert-kutane SSc n =51, diffus-kutane SSc n =28. **B** iNKT-Zellzahl gruppiert nach Autoantikörperstatus: Anti-ANA-Antikörper positive SSc n =82, Antinukleäre-Antikörper negative SSc n =6, Anti-Nucleoli-Antikörper positive SSc n =39, Anti-Sc170-Antikörper positive SSc n =25, Anti-Sc170-Antikörper negative SSc n =63, Anti-Zentromer-Antikörper positive SSc n =24, Anti-Zentromer-Antikörper negative SSc n =64. **C** iNKT-Zellzahl gruppiert nach Immunsuppression: Gesunde Kontrollen n =22, SSc ohne Immunsuppression n =37, SSc mit Immunsuppression n= 51 ANA: Antinukleäre-Antikörper. Nucleoli: Anti-Nucleoli-Antikörper. Sc170: Anti-Sc170-Antikörper. ACA: Anti-Zentromer-Antikörper. IS: Immunsuppression. SSc: Systemische Sklerose. Balken zeigen Mittelwerte, Antennen die Standardabweichung.

nach: Pecher, Kettmann. *Arthritis Research & Therapy*. 2019 21:212.[34]

6.4.2 Korrelation von iNKT-Zellzahlen mit klinischen Parametern

Analog zur Betrachtung von Surrogatparametern untersuchten wir Korrelationen von iNKT-Zellzahl und etablierten, laborchemischen Parametern der Krankheitsaktivität. Es zeigte sich keine Korrelation zwischen iNKT-Zellzahl im peripheren Blut und mRSS, CRP, BSG, γ -Globulinen oder Erkrankungsdauer (Abb. 11A-E).

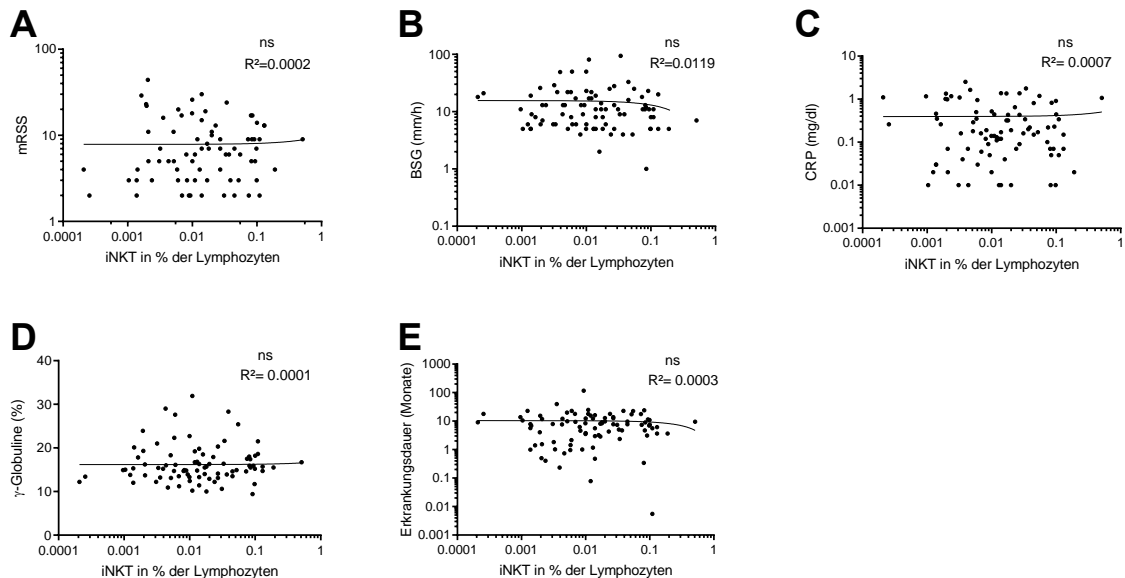


Abbildung 11: iNKT-Zellzahlen zeigen keine Korrelation mit Indikatoren der Krankheitsaktivität

iNKT-Zellzahlen von SSc Patienten wurden mit Surrogatparametern für Krankheitsaktivität korreliert. Hierbei konnten keine Korrelationen aufgezeigt werden. **A** iNKT-Zellen und Hautbeteiligung. **B** iNKT-Zellen und Blutsenkungsgeschwindigkeit. **C** iNKT-Zellen und der Entzündungsmarker CRP. **D** iNKT-Zellen und γ -Globuline. **E** iNKT-Zellen und Erkrankungsdauer. mRSS: modifizierter Rodnan-Skin-Score. BSG: Blutsenkungsgeschwindigkeit. CRP: C-reaktives Protein. R^2 : Determinationskoeffizient.

nach: Pecher, Kettmann. *Arthritis Research & Therapy*. 2019 21:212.[34]

7 Diskussion

SSc ist eine rheumatische Erkrankung, deren klinisches Merkmal eine zunehmende Sklerose der Haut und innerer Organe darstellt. Der hinter der Erkrankung stehende Pathomechanismus erstreckt sich über die drei Dimensionen vaskulärer Dysfunktion, immunologischer Anomalitäten und veränderter Extrazellulärmatrix [5]. Im Detail bleibt das komplexe Zusammenspiel dieser Faktoren bisher jedoch unverstanden. Zusammen mit limitierten Therapieoptionen ist dies für eine der höchsten Mortalitätsraten unter rheumatischen Erkrankungen verantwortlich [35]. Ein besseres Verständnis der zu Grunde liegenden Pathomechanismen ist essenziell für eine Verbesserung der Therapie der Erkrankung.

Gleichzeitig häufen sich vielversprechende Forschungsergebnisse zur pathologischen Funktion und therapeutischen Nutzbarmachung von iNKT-Zellen bei autoimmunen Krankheitsbildern. In dieser Arbeit wurde deshalb die Rolle von iNKT-Zellen im Krankheitsgeschehen der SSc anhand peripherer Blutproben von Patienten untersucht.

7.1 Verminderte iNKT-Zellen bei SSc

In einer Untersuchung an drei Patienten beschrieben Sumida et al. 1995 erstmals eine Reduktion von Zellen mit dem TZR $V\alpha 24J\alpha Q$ bei SSc [36]. Dies veranlasste die Autoren zu Vermutungen über regulatorische Funktionen dieser Zellen im Kontext der Erkrankung. Riccieri et al. fanden 2005 in einer Studie an 50 SSc-Patienten reduzierte Zellen, welche CD3 und die NK-Zellmarker CD16 und CD56 koexprimieren [32].

Die Verminderung von iNKT-Zellen ist ein bei Autoimmunerkrankungen häufig auftretendes Phänomen [33]. iNKT-Zellen scheinen grundlegende Mechanismen der Autoreaktivität zu regulieren und ihr fehlender Einfluss könnte zum Bruch der Immuntoleranz körpereigener Antigene beitragen oder sogar direkt für diesen verantwortlich sein. Es manifestiert sich eine Autoimmunerkrankung, die abhängig von weiteren Faktoren in Form verschiedener Krankheitsbilder auftritt.

Die Ursache der iNKT-Zellverminderung bleibt unklar. Denkbar ist einerseits eine verminderte Produktion von iNKT-Zellen auf Grund von Störungen in der natürlichen iNKT-Zellgenese. Bei SSc sind Abnormalitäten der TGF- β Signalwege ausführlich dokumentiert [37]. Dieselben Signalwege spielen eine Schlüsselrolle in der iNKT-Zellentwicklung [38] und könnten so für eine defizitäre iNKT-Zellreifung verantwortlich sein. Andererseits könnte eine verstärkte Migration von iNKT-Zellen in andere Körperkompartimente stattfinden und eine relative Abnahme im peripheren Blut verursachen. Aus Studien anderer Autoimmunerkrankungen ist jedoch keine erhöhte Anzahl von iNKT-Zellen in Kompartimenten mit entzündlicher Aktivität bekannt [39, 40]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen eine weitere Möglichkeit für die erniedrigten iNKT-Zellzahlen wahrscheinlich erscheinen: Eine insuffiziente Proliferation reifer iNKT-Zellen durch Störungen der Zellfunktion.

7.2 Alterationen der iNKT-Zellfunktion und Autoimmunität

Bisher nicht entdeckte Mechanismen führen zum Bruch der entscheidenden Trennung von fremd und körpereigen durch das Immunsystem. Vermutliche Ursache ist ein in Dysbalance geratenes Gleichgewicht aus tolerogenen und immunaktivierenden Faktoren. Durch *in vitro* Experimente an iNKT-Zellen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass iNKT-Zellen SSc-Erkrankter nach Stimulation mit α -GalCer um ein Vielfaches weniger proliferieren als bei Gesunden. Auch im Körper könnte die physiologische Aktivierung von iNKT-Zellen nur eine unzureichende Reaktion hervorrufen. Ein Überwiegen immunaktivierender Rahmenbedingungen, die zum Ausbruch der Erkrankung beitragen, wäre die Folge. Unterstützt wird diese Vermutung durch Erkenntnisse aus murinen Studien: Einerseits entwickeln iNKT-Zell-defiziente Tiermodelle spontan autoimmun-ähnliche Erkrankungen [28], andererseits wirkt die iatrogene Aktivierung von iNKT-Zellen im Tiermodell protektiv gegen verschiedene Autoimmunerkrankungen oder verhindert deren Ausbruch sogar gänzlich [14, 27, 41]. Der zugrundeliegende Mechanismus könnte in einer veränderten Polarisierung von T-Helferzellen liegen. Ursache hierfür wäre ein, auf Grund fehlender tolerogener Einflüsse von iNKT-Zellen, verändertes Zytokinmilieu. Ähnliches wurde über iNKT-Zellen für Diabetes mellitus Typ I bei NOD-Mäusen

berichtet. Sie verfügen über eine verringerte Proliferationskapazität und mangelhafte Ausdifferenzierung zur Interleukinproduktion [42]. Mögliche Ursache für den Defekt könnten eine Überstimulation oder vorzeitige Seneszenz von iNKT-Zellen darstellen. Erstere könnte bei SSc durch defekte TGF- β Signalwege, zweitere durch exogene Faktoren, wie Umweltschadstoffe oder virale Infektionen verursacht werden [33].

7.3 Zytokine und Immunhomöostase bei SSc

T_{H17}-Zellen und ihrem Schlüsselzytokin IL-17 wird eine wichtige Rolle in der Pathogenese autoimmuner Erkrankungen wie Rheumatoider Arthritis und Multipler Sklerose zugeschrieben. In Labormäuse transfundierte T_{H17}-Zellen verursachen autoimmune Phänomene [43, 44]. Experimente *in vitro* und *in vivo* zeigen eine profibrotische und proinflammatorische Wirkung von IL-17 auf humane Fibroblasten und Endothelzellen sowie in Mausmodellen [45]. Eine Beteiligung von T_{H17}-Zellen am Krankheitsgeschehen der SSc ist allgemein anerkannt [46]. Die Mehrzahl der durchgeführten Studien zum Serumspiegel von IL-17 fanden erhöhte Werte bei SSc [47-52]. In bronchoalveolären Lavagen bei SSc-Patienten konnten erhöhte Spiegel von IL-17 und vermehrt T_{H17}-Zellen festgestellt werden [13]. *In vitro* Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten ebenfalls, dass ein T_{H17}-Bias unter T-Zellen bei SSc vorliegt. Interessanterweise zeigt sich die Tendenz zur vermehrten IL-17-Produktion durch T-Helferzellen bei Patienten unter Immunsuppression aufgehoben. Durch Hemmung der Zellteilung und DNA-Synthese wirken Immunsuppressiva auf die Zellen des Immunsystems. Die medikamentös verursachte Einschränkung der Zellaktivität ist eine plausible Ursache für die eingeschränkte IL-17-Produktion. Man kann weiterhin vermuten, dass die Blockade der überaktiven IL-17-Achse zum Ansprechen auf die Therapie beiträgt.

Unsere Experimente zeigten, dass auch aktivierte iNKT-Zellen bei SSc verstärkt IL-17 produzieren. Ob das veränderte Zytokinprofil der iNKT-Zellen ursächlich für die verstärkte T_{H17}-Polarisierung der T-Helferzellen ist, lässt sich anhand der durchgeführten Untersuchungen nicht beurteilen. Zwar entspräche dies dem postulierten Funktionsprinzip der Einflussnahme von iNKT-Zellen auf

Immunprozesse. Positive Feedbackschleifen wie im Falle von T_{H1} - und T_{H2} -Zellen über $IFN\gamma$ und IL-4, existieren bei T_{H17} -Zellen jedoch nicht [44]. Die Steigerung der IL-17-Produktion durch Helferzellen bei SSc ist daher nicht direkt auf von iNKT-Zellen sezerniertes IL-17 zurückzuführen. Vorstellbar ist aber, dass iNKT-Zellen die T_{H17} -Polarisierung von T-Helferzellen über die Sekretion anderer Zytokine vermitteln. iNKT-Zellen sezernieren IL-21 [53], ein Zytokin das ebenfalls zur T_{H17} -Differenzierung der T-Helferzellen beiträgt [54].

Ein Urteil über die Bedeutung für das Krankheitsgeschehen ist schwierig, da ambivalente Ergebnisse in der Literatur beschrieben sind. Einerseits beschreiben mehrere Studien, dass iNKT-Zellen im Kontext autoimmuner Erkrankungen IL-17 produzieren [55-57] und so fördernd zum Krankheitsgeschehen beitragen. Andererseits berichten Uemura et al., dass iNKT-Zellen über die Sekretion von IL-4 und IL-10 und die Interaktion mit dendritischen Zellen eine Verminderung der IL-17-Produktion bewirken [58]. Im Kontext der SSc könnte dies bedeuten, dass pathologisch veränderte iNKT-Zellen über verstärkte IL-17-Produktion die Entstehung von Sklerose begünstigen. Nach übermäßiger Aktivierung könnte ein verfrühtes Übergehen in die Seneszenz die niedrigen iNKT-Zahlen erklären. Eine andere Hypothese ist, dass *a priori* bestehende erniedrigte iNKT-Zahlen eine entfesselte IL-17-Produktion im Körper ermöglichen und die Erkrankung durch den fehlenden, hemmenden Einfluss der iNKT-Zellen begünstigt wird. Um diese Fragen zu beantworten, wären Untersuchungen an SSc-Patienten zu Beginn oder vor Ausbruch der Erkrankung hilfreich. Da sich SSc jedoch zunächst unspezifisch und über längere Zeiträume manifestiert, liegt meist eine verlängerte Zeitspanne zwischen Erstmanifestation und Erstdiagnose. Dieser Umstand erschwert eine wissenschaftliche Untersuchung zu Beginn der Erkrankung.

Die Kausalität könnte jedoch auch umgekehrt zu suchen sein. T_{H17} - und iNKT-Zellen könnten gleichermaßen reaktiv zur verstärkten IL-17 Produktion angeregt werden. Eine Überaktivität von TGF- β wäre ein plausibler Erklärungsansatz. Einerseits ist TGF- β einer der Hauptfaktoren der Differenzierung von T_{H17} -Zellen aus naiven T-Lymphozyten [59], andererseits

entwickeln Mausmodelle mit andauernder Aktivierung des TGF- β Signalweges einen SSc-ähnlichen Phänotyp [60].

Fortschreitende Gewebefibrose der Haut ist eines der charakteristischen klinischen Merkmale der SSc. Eine übermäßige Typ 2 Immunpolarisierung wird mit der Entstehung von Fibrose in Verbindung gebracht. Mehrere Studien berichten ein T_{H2}-Übergewicht bei SSc. Patienten zeigen erhöhte Werte des Typ 2 Zytokins IL-13 [8]. Dieses fördert die Entstehung von Fibrose, unter anderem indem es die Sezernierung des profibrotischen TGF- β in Makrophagen auslöst [61]. Auch das Typ 2 Zytokin IL-4 induziert profibrotische Mechanismen, wie die Proliferation von Fibroblasten und die Produktion extrazellulärer Matrix [62, 63]. In dieser Arbeit zeigte sich die IL-4-Produktion durch T-Helferzellen *in vitro* erniedrigt. Meloni et al. zeigen, dass Fibroblasten bei SSc vermehrt mit IL-4-Rezeptoren beladen sind und nach Stimulation mit IL-4 vermehrt Kollagen produzieren als gesunde Zellen [13]. Dies könnte erklären, dass trotz verminderter IL-4-Produktion die Wirkung des Zytokins im System dennoch überwiegt und Fibrose begünstigt. Weiterhin sind widersprüchliche Ergebnisse aus Studien zur Immunpolarisierung bei SSc bekannt. Katsumoto et al. mutmaßen in ihrer Übersichtsarbeit, dass die Erkrankung auch zeitlich heterogen beschaffen sein könnte und dies abweichende Ergebnisse erklären könne [64].

7.4 Korrelation zu Krankheitsaktivität

Unsere Daten zeigen keine Korrelation von iNKT-Zellzahl und Entzündungszeichen wie BSG, CRP oder γ -Globulinen. Auch Parameter, die die Schwere der Erkrankung quantifizieren, waren nicht mit iNKT-Zellen korreliert. Die iNKT-Zellzahl scheint also unabhängig vom Verlauf und der Schwere der Erkrankung zu sein. Es finden sich widersprüchliche Ergebnisse zur selben Fragestellung in der Literatur [32, 33]. Bei vielen der genannten Parameter handelt es sich um allgemeine Indikatoren für ein im Körper ablaufendes Entzündungsgeschehen. Gleichzeitig bestehende bakterielle oder virale Infektionen stellen einen möglichen Störfaktor der Ergebnisse dar und schränken die Aussagekraft der Analyse ein. Autoimmunerkrankungen sind multifaktoriell bedingt und SSc ist eine heterogene Erkrankung. Eine direkte Korrelation von

iNKT-Zellzahlen und Entzündungsaktivität scheint deshalb als zu kurz gegriffen. Vielmehr könnte der verminderte tolerogene Einfluss der iNKT-Zellen zur grundsätzlichen Aufrechterhaltung eines proinflammatorischen Milieus beitragen. Eine weitere Vermutung ist, dass eine defizitäre iNKT-Zell-Achse nicht zum Zeitpunkt der manifesten Autoimmunerkrankung, sondern im Prozess ihrer Entstehung zum Tragen kommt.

7.5 Ausblick: iNKT-Zellen und Immuntherapie

Die Möglichkeit der therapeutischen Nutzung von iNKT-Zellen klingt vielversprechend und wird bereits im Kontext der Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (engl. Graft-versus-Host-Disease, GvHD) erforscht. Die GvHD ist eine Komplikation nach Stammzelltransplantation, bei der transplantierte T-Zellen gesunde Gewebe des Empfängers angreifen. Sie manifestiert sich vor allem an der Haut und inneren Organen wie dem Darm. Interessanterweise präsentiert sie sich klinisch und histopathologisch mit starker Ähnlichkeit zur SSc [65-67]. Im Mausmodell für allogene Stammzell-transplantation konnte gezeigt werden, dass adoptiv transferierte iNKT-Zellen in der Lage sind dem Auftreten einer GvHD vorzubeugen [68]. Studien am Menschen belegen, dass im Kontext allogener Stammzelltransplantation höhere iNKT-Zahlen invers mit der Inzidenz einer GvHD korrelieren [69, 70]. Die Ergebnisse verdeutlichen die Fähigkeit dieser Zellpopulation, Immuntoleranzmechanismen wieder-herzustellen und zu erhalten. Auf Grund der Ähnlichkeiten beider Erkrankungen, erscheint auch eine Ausweitung dieses Therapieansatzes auf SSc als vielversprechender Ansatz.

Die in dieser Arbeit gezeigte, defizitäre Proliferation von iNKT-Zellen bei SSc stellt jedoch eine Hürde für die Erhöhung der iNKT-Zell-Präsenz bei SSc-Erkrankten dar. Zudem brachten Versuche einer *in vivo* Expansion von iNKT-Zellen im Menschen durch medikamentöse Stimulation bisher keine Erfolge [71, 72].

CD1d und der zugehörige TZR sind bei Säugetieren hochkonservierte Strukturen. Sie besitzen starke strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit und interagieren interindividuell und sogar spezie-übergreifend [73]. Zusammen mit der guten Expandierbarkeit von iNKT-Zellen *ex vivo* ergibt sich eine interessante

Therapiemöglichkeit [74]: Kompetente iNKT-Zellen gesunder Spender könnten *ex vivo* expandiert und anschließend SSc-Erkrankten infundiert werden. Bemerkenswerterweise zeigte sich dieser Ansatz im Mausmodell im Kontext der GvHD bereits als erfolgreich [75].

Auf diese Weise könnte einerseits die niedrige Ausgangszahl und andererseits die defizitäre Proliferation von iNKT-Zellen im Kontext einer zellbasierten Immuntherapie für die SSc überwunden werden.

8 Zusammenfassung

Die Systemische Sklerose (SSc) ist eine rheumatische Erkrankung, die mit Immunsuppressiva nur unzureichend therapiert werden kann. Die Pathogenese der SSc basiert auf einem Bruch der immunologischen Toleranz gegenüber endogenen Antigenen und ist durch eine progressive Fibrosierung vitaler Organe gekennzeichnet. Humane iNKT-Zellen werden durch einen semi-invarianten T-Zellrezeptor (TZR α V α 24-J α 18) mit hoher Affinität zu Glykolipiden definiert. Typischerweise sezernieren iNKT-Zellen große Mengen immunregulatorischer Zytokine (z.B. IFN γ , IL-4, IL-17, u.a.) und nehmen durch ihre Interaktion mit anderen lymphatischen und myeloischen Zellen einen zentralen Platz im immunregulatorischen Netzwerk ein. Die immunregulierende Bedeutung der iNKT-Zellen für die Pathogenese der SSc ist bisher kaum untersucht. Ziel dieser Arbeit war deshalb, die funktionelle Bedeutung von iNKT-Zellen für die Pathogenese der SSc zu überprüfen.

Hierzu wurden PBMC aus peripherem Blut von 88 SSc-Patienten und 33 gesunden Probanden durchflusszytometrisch untersucht. Die Zytokinproduktion und Proliferation der Lymphozyten wurden in Zellkultur-Versuchen analysiert.

Es zeigte sich eine deutliche Reduktion der iNKT-Zellzahl im Blut der Patienten, wohingegen T-Zellen, B-Zellen und T_{reg} in vergleichbarer Anzahl detektiert wurden. Es zeigte sich keine Korrelation der Anzahl von iNKT-Zellen und BSG, CRP, Autoantikörpern, γ -Globulinen, Erkrankungsdauer, Schwere des Hautbefalls oder Einnahme von Immunsuppressiva. Sowohl für iNKT-Zellen als auch T-Helferzellen zeigte sich *in vitro* eine vermehrte Produktion von IL-17. T-Helferzellen produzieren zudem weniger IL-4. iNKT-Zellen zeigten funktionelle Beeinträchtigungen in Form eines ausgeprägten Proliferationsdefizits.

Unsere Ergebnisse liefern weitere Erkenntnisse zur Immunpathologie der SSc. iNKT-Zellen sind verringert und zeigen ein verändertes Zytokinprofil. Obwohl pathologisch verändert, scheinen sie individuelle Surrogatparameter für die Krankheitsaktivität nach Ausbruch der Erkrankung nicht direkt zu beeinflussen. Der Nachweis funktioneller Störungen von iNKT-Zellen bei SSc eröffnet interessante Ansätze für neue immuntherapeutische Möglichkeiten.

9 Literaturverzeichnis

1. Furst, D.E., et al., *Epidemiology of systemic sclerosis in a large US managed care population*. J Rheumatol, 2012. **39**(4): p. 784-6.
2. Jacobsen, S., et al., *Influence of clinical features, serum antinuclear antibodies, and lung function on survival of patients with systemic sclerosis*. J Rheumatol, 2001. **28**(11): p. 2454-9.
3. Tyndall, A.J., et al., *Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database*. Ann Rheum Dis, 2010. **69**(10): p. 1809-15.
4. Ioannidis, J.P., et al., *Mortality in systemic sclerosis: an international meta-analysis of individual patient data*. Am J Med, 2005. **118**(1): p. 2-10.
5. Katsumoto, T.R., M.L. Whitfield, and M.K. Connolly, *The pathogenesis of systemic sclerosis*. Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 509-37.
6. Nagaraja, V., C.P. Denton, and D. Khanna, *Old medications and new targeted therapies in systemic sclerosis*. Rheumatology (Oxford), 2015. **54**(11): p. 1944-53.
7. Charles, C., P. Clements, and D.E. Furst, *Systemic sclerosis: hypothesis-driven treatment strategies*. Lancet, 2006. **367**(9523): p. 1683-91.
8. Riccieri, V., et al., *Interleukin-13 in systemic sclerosis: relationship to nailfold capillaroscopy abnormalities*. Clin Rheumatol, 2003. **22**(2): p. 102-6.
9. Sakkas, L.I. and C.D. Platsoucas, *Is systemic sclerosis an antigen-driven T cell disease?* Arthritis Rheum, 2004. **50**(6): p. 1721-33.
10. Wynn, T.A., *Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(8): p. 583-94.
11. Radstake, T.R., et al., *Increased frequency and compromised function of T regulatory cells in systemic sclerosis (SSc) is related to a diminished CD69 and TGFbeta expression*. PLoS One, 2009. **4**(6): p. e5981.
12. Radstake, T.R., et al., *The pronounced Th17 profile in systemic sclerosis (SSc) together with intracellular expression of TGFbeta and IFNgamma distinguishes SSc phenotypes*. PLoS One, 2009. **4**(6): p. e5903.
13. Meloni, F., et al., *Frequency of Th1, Th2 and Th17 producing T lymphocytes in bronchoalveolar lavage of patients with systemic sclerosis*. Clin Exp Rheumatol, 2009. **27**(5): p. 765-72.
14. Bendelac, A., P.B. Savage, and L. Teyton, *The biology of NKT cells*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 297-336.
15. Bienemann, K., et al., *iNKT cell frequency in peripheral blood of Caucasian children and adolescent: the absolute iNKT cell count is stable from birth to adulthood*. Scand J Immunol, 2011. **74**(4): p. 406-11.
16. Fereidouni, M., et al., *Frequency of circulating iNKT cells among Iranian healthy adults*. Cytometry B Clin Cytom, 2010. **78**(1): p. 65-9.
17. Peralbo, E., et al., *Decreased frequency and proliferative response of invariant Valpha24Vbeta11 natural killer T (iNKT) cells in healthy elderly*. Biogerontology, 2006. **7**(5-6): p. 483-92.
18. Jing, Y., et al., *Aging is associated with a rapid decline in frequency, alterations in subset composition, and enhanced Th2 response in CD1d-*

- restricted NKT cells from human peripheral blood. Exp Gerontol, 2007. 42(8): p. 719-32.*
19. Kawano, T., et al., *CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. Science, 1997. 278(5343): p. 1626-9.*
 20. Zlotnik, A., et al., *Cytokine production by mature and immature CD4-CD8- T cells. Alpha beta-T cell receptor+ CD4-CD8- T cells produce IL-4. J Immunol, 1992. 149(4): p. 1211-5.*
 21. Gumperz, J.E., et al., *Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. J Exp Med, 2002. 195(5): p. 625-36.*
 22. Kronenberg, M., *Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. Annu Rev Immunol, 2005. 23: p. 877-900.*
 23. Baxter, A.G., et al., *Association between alphabetaTCR+CD4-CD8- T-cell deficiency and IDDM in NOD/Lt mice. Diabetes, 1997. 46(4): p. 572-82.*
 24. Godfrey, D.I., et al., *Flow cytometric study of T cell development in NOD mice reveals a deficiency in alphabetaTCR+CD8- thymocytes. J Autoimmun, 1997. 10(3): p. 279-85.*
 25. Gombert, J.M., et al., *Early quantitative and functional deficiency of NK1+-like thymocytes in the NOD mouse. Eur J Immunol, 1996. 26(12): p. 2989-98.*
 26. Hong, S., et al., *The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. Nat Med, 2001. 7(9): p. 1052-6.*
 27. L. Gabriel, C., et al., *Invariant Natural Killer T Cell-Based Therapy of Autoimmune Diseases. Current Immunology Reviews, 2010. 6(2): p. 88-101.*
 28. Sireci, G., et al., *Immunoregulatory role of Jalpha281 T cells in aged mice developing lupus-like nephritis. Eur J Immunol, 2007. 37(2): p. 425-33.*
 29. Akbari, O., *The role of iNKT cells in development of bronchial asthma: a translational approach from animal models to human. Allergy, 2006. 61(8): p. 962-8.*
 30. Miyamoto, K., S. Miyake, and T. Yamamura, *A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. Nature, 2001. 413(6855): p. 531-4.*
 31. Zeng, D., et al., *Activation of natural killer T cells in NZB/W mice induces Th1-type immune responses exacerbating lupus. J Clin Invest, 2003. 112(8): p. 1211-22.*
 32. Riccieri, V., et al., *Reduced circulating natural killer T cells and gamma/delta T cells in patients with systemic sclerosis. J Rheumatol, 2005. 32(2): p. 283-6.*
 33. van der Vliet, H.J., et al., *Circulating V(alpha24+) Vbeta11+ NKT cell numbers are decreased in a wide variety of diseases that are characterized by autoreactive tissue damage. Clin Immunol, 2001. 100(2): p. 144-8.*
 34. Pecher, A.C., et al., *Invariant natural killer T cells are functionally impaired in patients with systemic sclerosis. Arthritis Res Ther, 2019. 21(1): p. 212.*

35. Mayes, M.D., et al., *Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(8): p. 2246-55.
36. Sumida, T., et al., *Selective reduction of T cells bearing invariant V alpha 24J alpha Q antigen receptor in patients with systemic sclerosis*. J Exp Med, 1995. **182**(4): p. 1163-8.
37. Leask, A., *Scar wars: is TGFbeta the phantom menace in scleroderma?* Arthritis Res Ther, 2006. **8**(4): p. 213.
38. Doisne, J.M., et al., *iNKT cell development is orchestrated by different branches of TGF-beta signaling*. J Exp Med, 2009. **206**(6): p. 1365-78.
39. Maeda, T., et al., *Decreased TCR AV24AJ18+ double-negative T cells in rheumatoid synovium*. Rheumatology, 1999. **38**(2): p. 186-188.
40. Illes, Z., et al., *Differential expression of NK T cell V alpha 24J alpha Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy*. J Immunol, 2000. **164**(8): p. 4375-81.
41. Van Kaer, L., V.V. Parekh, and L. Wu, *Invariant natural killer T cells: bridging innate and adaptive immunity*. Cell Tissue Res, 2011. **343**(1): p. 43-55.
42. Falcone, M., et al., *A defect in interleukin 12-induced activation and interferon gamma secretion of peripheral natural killer T cells in nonobese diabetic mice suggests new pathogenic mechanisms for insulin-dependent diabetes mellitus*. J Exp Med, 1999. **190**(7): p. 963-72.
43. Langrish, C.L., et al., *IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation*. J Exp Med, 2005. **201**(2): p. 233-40.
44. Miossec, P., *IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases*. Microbes Infect, 2009. **11**(5): p. 625-30.
45. Chizzolini, C., A.M. Dufour, and N.C. Brembilla, *Is there a role for IL-17 in the pathogenesis of systemic sclerosis?* Immunol Lett, 2018. **195**: p. 61-67.
46. Goncalves, R.S.G., et al., *IL-17 and related cytokines involved in systemic sclerosis: Perspectives*. Autoimmunity, 2018. **51**(1): p. 1-9.
47. Kurasawa, K., et al., *Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(11): p. 2455-63.
48. Murata, M., et al., *Clinical association of serum interleukin-17 levels in systemic sclerosis: is systemic sclerosis a Th17 disease?* J Dermatol Sci, 2008. **50**(3): p. 240-2.
49. Nakashima, T., et al., *Impaired IL-17 signaling pathway contributes to the increased collagen expression in scleroderma fibroblasts*. J Immunol, 2012. **188**(8): p. 3573-83.
50. Rolla, G., et al., *Th-17 cytokines and interstitial lung involvement in systemic sclerosis*. J Breath Res, 2016. **10**(4): p. 046013.
51. Xing, X., et al., *IL-17A induces endothelial inflammation in systemic sclerosis via the ERK signaling pathway*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e85032.
52. Higgs, B.W., et al., *Identification of activated cytokine pathways in the blood of systemic lupus erythematosus, myositis, rheumatoid arthritis, and scleroderma patients*. Int J Rheum Dis, 2012. **15**(1): p. 25-35.

53. King, I.L., et al., *Invariant natural killer T cells direct B cell responses to cognate lipid antigen in an IL-21-dependent manner*. Nature Immunology, 2012. **13**(1): p. 44-50.
54. Bettelli, E., M. Oukka, and V.K. Kuchroo, *T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity*. Nat Immunol, 2007. **8**(4): p. 345-50.
55. Yoshiga, Y., et al., *Invariant NKT cells produce IL-17 through IL-23-dependent and -independent pathways with potential modulation of Th17 response in collagen-induced arthritis*. Int J Mol Med, 2008. **22**(3): p. 369-74.
56. Moreira-Teixeira, L., et al., *Proinflammatory environment dictates the IL-17-producing capacity of human invariant NKT cells*. J Immunol, 2011. **186**(10): p. 5758-65.
57. Rachitskaya, A.V., et al., *Cutting edge: NKT cells constitutively express IL-23 receptor and ROR γ and rapidly produce IL-17 upon receptor ligation in an IL-6-independent fashion*. J Immunol, 2008. **180**(8): p. 5167-71.
58. Uemura, Y., et al., *Cytokine-dependent modification of IL-12p70 and IL-23 balance in dendritic cells by ligand activation of Valpha24 invariant NKT cells*. J Immunol, 2009. **183**(1): p. 201-8.
59. Mangan, P.R., et al., *Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 231-4.
60. Sonnylal, S., et al., *Postnatal induction of transforming growth factor beta signaling in fibroblasts of mice recapitulates clinical, histologic, and biochemical features of scleroderma*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(1): p. 334-44.
61. Abraham, D.J. and J. Varga, *Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to disease models*. Trends Immunol, 2005. **26**(11): p. 587-95.
62. Makhlof, H.A., et al., *IL-4 upregulates tenascin synthesis in scleroderma and healthy skin fibroblasts*. J Invest Dermatol, 1996. **107**(6): p. 856-9.
63. McGaha, T.L., et al., *Molecular mechanisms of interleukin-4-induced up-regulation of type I collagen gene expression in murine fibroblasts*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(8): p. 2275-84.
64. Katsumoto, T.R., S.M. Violette, and D. Sheppard, *Blocking TGFbeta via Inhibition of the alphavbeta6 Integrin: A Possible Therapy for Systemic Sclerosis Interstitial Lung Disease*. Int J Rheumatol, 2011. **2011**: p. 208219.
65. Jaffee, B.D. and H.N. Claman, *Chronic graft-versus-host disease (GVHD) as a model for scleroderma: I. Description of model systems*. Cellular Immunology, 1983. **77**(1): p. 1-12.
66. Spielvogel, R.L., R.W. Goltz, and J.H. Kersey, *Scleroderma-like Changes in Chronic Graft vs Host Disease*. Archives of Dermatology, 1977. **113**(10): p. 1424-1428.
67. Claman, H.N., *On Scleroderma: Mast Cells, Endothelial Cells, and Fibroblasts*. JAMA, 1989. **262**(9): p. 1206-1209.
68. Schneidawind, D., et al., *CD4+ invariant natural killer T cells protect from murine GVHD lethality through expansion of donor CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells*. Blood, 2014. **124**(22): p. 3320-8.

69. Chaidos, A., et al., *Graft invariant natural killer T-cell dose predicts risk of acute graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. *Blood*, 2012. **119**(21): p. 5030-6.
70. Rubio, M.T., et al., *Early posttransplantation donor-derived invariant natural killer T-cell recovery predicts the occurrence of acute graft-versus-host disease and overall survival*. *Blood*, 2012. **120**(10): p. 2144-54.
71. Chen, Y.-B., et al., *Increased Foxp3+Helios+ Regulatory T Cells and Decreased Acute Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Bone Marrow Transplantation in Patients Receiving Sirolimus and RGI-2001, an Activator of Invariant Natural Killer T Cells*. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2017. **23**(4): p. 625-634.
72. Giaccone, G., et al., *A phase I study of the natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors*. *Clin Cancer Res*, 2002. **8**(12): p. 3702-9.
73. Brossay, L., et al., *CD1d-mediated recognition of an alpha-galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution*. *J Exp Med*, 1998. **188**(8): p. 1521-8.
74. Schmid, H., et al., *Culture-Expanded Human Invariant Natural Killer T Cells Suppress T-Cell Alloreactivity and Eradicate Leukemia*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 1817.
75. Schneidawind, D., et al., *Third-party CD4+ invariant natural killer T cells protect from murine GVHD lethality*. *Blood*, 2015. **125**(22): p. 3491-500.

10 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde an der Universitätsklinik Tübingen, Abteilung Innere Medizin II im Labor für Transplantationsimmunologie unter Betreuung von Prof. Dr. Jörg Henes (Leiter Bereich Rheumatologie) und Dr. Dominik Schneidawind (Arbeitsgruppenleiter Labor Transplantationsimmunologie) durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Dr. Ann-Christin Pecher (Ärztin in Weiterbildung, Abt. Rheumatologie) in Zusammenarbeit mit Dr. Dominik Schneidawind. Die Aufklärung zur Studie sowie die Erhebung der klinischen Parameter des Patientenkollektivs erfolgte durch Ann-Christin Pecher.

Die Versuche, durchflusszytometrische Messungen und Analysen wurden nach Einarbeitung durch M.Sc. Hannes Schmid von mir eigenständig durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Beratung durch das Institut für Biometrie durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Forschungsergebnisse wurden in Form eines wissenschaftlichen Artikels publiziert. Die Verwendung für die vorliegende Arbeit erfolgt im Einverständnis sämtlicher Koautoren.

Esslingen, den 01.05.2020



Felix Kettemann

11 Danksagung

Für die Überlassung des Themas danke ich PD Dr. Dominik Schneidawind und Prof. Dr. Jörg Henes. Danke für die fundierte Betreuung in allen fachlichen Fragen und die Einführung in die Welt der Wissenschaft.

Danke an Dr. Ann-Christin Pecher für die hervorragende Zusammenarbeit und die bereitwillige Beratung in klinischen Fragen.

Danke an das IZKF, Fr. Prof. Knipper und Fr. Dr. Montero für die Förderung und die Betreuung mit wertvollen Ratschlägen zum Schreiben einer Dissertation.

Danke an die Mitglieder der FACS-Core-Facility Berg für die enge Zusammenarbeit und die vielen wertvollen Ratschläge zur Durchflusszytometrie.

Danke an die Mitglieder der Arbeitsgruppe Schneidawind, Silke, Hilde, Kathy, Simona, Elisa, Hannes, Timo, Marcus, und Lukas. Danke an PD Dr. Stella Autenrieth, Manina, Kristin, Nicole und Jenny. Einerseits für die bereitwillige fachliche Hilfe, aber auch die freundliche Aufnahme im Laborleben der Inneren Medizin II.

Einen besonderen Dank möchte ich meinen Eltern aussprechen. Danke für die immerwährende Unterstützung.