

Aus der  
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen  
Abteilung Innere Medizin II  
(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie,  
Klinische Immunologie, Rheumatologie)

**Nachweis funktioneller Autoantikörper gegen den  
Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptor bei Patienten mit  
Systemischer Sklerose**

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

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

**vorgelegt von  
Bankamp, Lukas  
2023**

Dekan: Professor Dr. B. Picheler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. R. Klein

2. Berichterstatter: Professorin Dr. K. Schilbach-Stückle

3. Berichterstatter: Professor Dr. T. Daikeler

Tag der Disputation: 07.11.2023

Ich widme diese Doktorarbeit  
meiner Familie und Rebecca.

## **Inhaltsverzeichnis**

Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung	11
1.1 Systemische Sklerose	11
1.1.1 Historie des Begriffs	11
1.1.2 Klassifikation	12
1.1.3 Verlaufsformen	15
1.1.4 Epidemiologie	16
1.1.5 Ätiopathogenese	17
1.1.6 Organmanifestationen	20
1.1.7 Autoantikörper	26
1.1.8 Funktionelle Autoantikörper	29
1.1.9 Diagnostik	32
1.1.10 Therapie	35
1.1.11 Risikofaktoren und Mortalität	38
1.2 Angiotensin II und Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptor	39
1.3 Guanosintriphosphat-bindende-Protein-gekoppelte Rezeptoren	40
1.4 Assay zum Nachweis funktioneller Antikörper	41
1.5 Zielsetzung	42
2 Patienten und Kontrollen	43
3 Material und Methoden	46
3.1 Materialien	46
3.1.1 Verbrauchsmaterialien	46
3.1.2 Geräte	47
3.1.3 Computerprogramme	48
3.1.4 Chemikalien und Reagenzien	48
3.1.5 Plasmide	50
3.1.6 Antikörper für die Westernblots	51

3.1.7	Zellen	51
3.1.8	Zellkulturmedium bzw. -reagenzien	51
3.2	Puffer und Lösungen	52
3.2.1	SDS-PAGE	52
3.2.2	Odyssey-NIR-Westernblot	53
3.2.3	In-Zell-Westernblot	54
3.2.4	Zellkulturmedien	54
3.2.5	AT1R-Assay	54
3.3	Methoden	55
3.3.1	Zelllinien	55
3.3.2	Präzipitation von Immunglobulinen aus Patientenserum mittels Ammoniumsulfat und Melon™ Gel IgG Purification Kit	57
3.3.3	Proteinbestimmung nach Bradford	57
3.3.4	Funktioneller Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptor-Assay	57
3.3.5	Luciferase-Assay	61
3.3.6	Plasmamembran-Isolierung	63
3.3.7	Westernblot-Analysen	63
3.3.8	Odyssey-Westernblot	64
3.3.9	In-Zell-Westernblot von Huh-7 mit Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptor-Antikörpern	65
3.3.10	Statistische Auswertung	65
4	Ergebnisse	66
4.1	Nachweis des AT <sub>1</sub> R auf Huh-7-Zellen	66
4.1.1	Odyssey-Westernblot zum Nachweis des AT <sub>1</sub> R auf der Plasmamembran der Huh-7-Zellen	66
4.1.2	In-Zell-Westernblot mit einem Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptor-Antikörper (Biotec)	67
4.2	Optimierung des AT <sub>1</sub> R-Assay mit CHOG5A-Zellen	68
4.2.1	Überprüfung der Vergleichbarkeit der Sensoren	68
4.2.2	Ermittlung der optimalen CHOG5A-Zellkonzentration pro Well	69
4.2.3	FuGene-6-zu-Plasmid-Verhältnis	70
4.2.4	Validierung des Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptors auf transfizierten CHOG5A-Zellen mittels Losartan	71

4.3	AT <sub>1</sub> R-Assay mit GFP-transfizierten Huh-7-Zellen	72
4.3.1	Validierung des AT <sub>1</sub> R auf der Plasmamembran GFP/Aequorin-transfizierter Huh-7-Zellen mittels Losartan	73
4.3.2	Vergleich von Melon-Gel- und Ammoniumsulfat-gefällten Seren im AT <sub>1</sub> R-Assay mit Huh-7-Zellen	73
4.3.3	Optimierung der Immunglobulin-Konzentration im AT <sub>1</sub> R-Assay mit Huh-7-Zellen	75
4.3.4	Proteinbestimmung nach Bradford	76
4.4	AT <sub>1</sub> R-Assay	76
4.4.1	Nachweis funktioneller Anti-AT <sub>1</sub> R-Antikörper in Patienten mit verschiedenen Erkrankungen	76
4.4.2	Prävalenz funktioneller Anti-AT <sub>1</sub> R-Antikörper bei Patienten mit SSc	81
4.4.3	Prävalenz funktioneller stimulierender und inhibierender Anti-AT <sub>1</sub> R-Antikörper in Patienten mit SSc in Relation zu verschiedenen Organmanifestationen	84
4.5	Einfluss einer autologen hämatogenen Stammzelltransplantation auf die Prävalenz und Reaktivität funktioneller Anti-AT <sub>1</sub> R-Antikörper bei Patienten mit SSc	92
4.6	Optimierung des Luciferase-Assays	95
4.6.1	Vergleich der CHO-K1- und Huh-7-Zellreihen	95
4.6.2	Vergleich der Transfektionsreagenzien FuGene 6™ und ViaFect™	98
4.6.3	Validierung des AT <sub>1</sub> R auf den CHO-K1-Zellen im Luciferase-Assay	100
4.6.4	Optimierung der Immunglobulin-Verdünnung	101
4.6.5	Vergleich des Luciferase-Assays mit dem AT <sub>1</sub> R-Assay	102
4.6.6	Vergleich der beiden Assays mit Seren von stammzelltransplantierten SSc-Patienten	104
5	Diskussion	104
5.1	Bisherige Methoden zum Nachweis funktioneller Anti-AT <sub>1</sub> R-Antikörper	105
5.2	AT <sub>1</sub> R-Assay	106
5.3	Luciferase-Assay	110

5.4	Spezifität des Odyssey- und In-Zell-Westernblots zum Nachweis der Expression des AT <sub>1</sub> R auf der Plasmamembran der Huh-7-Zellen _____	112
5.5	Bedeutung funktioneller Anti-AT <sub>1</sub> R-Antikörper bei Patienten mit SSc _____	114
5.6	Bedeutung von Autoantikörpern nach einer aHSZT bei Patienten mit SSc _____	117
5.7	Bedeutung von Anti-AT <sub>1</sub> R-Antikörpern bei weiteren Erkrankungen_	119
5.8	Schlussfolgerung und Ausblick _____	122
6	Zusammenfassung _____	123
	Literaturverzeichnis _____	126
	Erklärung zum Eigenanteil _____	140
7	Veröffentlichung _____	141
8	Danksagung _____	142

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Huh-7-Zellen mit einer Konfluenz von ca. 80 %, durch das Mikroskop fotografiert (Quelle: Eigene Darstellung).....	56
Abbildung 2: Skizze des Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptor-Assay mit Huh-7-Zellen .....	58
Abbildung 3: Odyssey-Westernblot mit Huh-7-Plasmamembranen und Anti-AT <sub>1</sub> R-Antikörper .....	67
Abbildung 4: In-Zell-Westernblot mit unfixierten und Formaldehyd- bzw. Methanol-behandelten Huh-7-Zellen .....	68
Abbildung 5: Vergleich der zwei Sensoren des MicroBeta <sup>2</sup> LumiJET .....	69
Abbildung 6: Ermittlung der optimalen Zellkonzentration im AT <sub>1</sub> R Assay mit AT <sub>1</sub> R-transfizierten CHO5A-Zellen .....	70
Abbildung 7: Ermittlung des FuGene-6-zu-AT <sub>1</sub> R-Plasmid-Verhältnisses.....	71
Abbildung 8: Hemmung von AT <sub>1</sub> R-transfizierten CHO5A-Zellen mittels Losartan .....	72
Abbildung 9: Validierung des Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptors auf Huh-7-Zellen mittels Losartan .....	73
Abbildung 10: Vergleich der Ammoniumsulfat- und Melon-Gel-gefällten Seren im AT <sub>1</sub> R-Assay .....	74
Abbildung 11: Ermittlung der optimalen Immunoglobulin-Konzentration im AT <sub>1</sub> R-Assay.....	75
Abbildung 12: Aktivität von Anti-AT <sub>1</sub> R-Antikörpern in Seren von SSc-Patienten gegenüber Patienten mit anderen Erkrankungen und gesunden Probanden gemessen im AT <sub>1</sub> R-Assay .....	78
Abbildung 13: Aktivität von Anti-AT <sub>1</sub> R-Antikörpern in Seren von gesunden Probanden gegenüber Patienten mit anderen Erkrankungen gemessen im AT <sub>1</sub> R-Assay.....	79
Abbildung 14: Reaktivität funktioneller Anti-AT <sub>1</sub> R-Antikörper in Seren von SSc-Patienten unterschiedlicher Altersklassen.....	81
Abbildung 15: Reaktivität von Anti-AT <sub>1</sub> R-Antikörpern bei männlichen (n = 11) und weiblichen (n = 62) SSc-Patienten .....	82



Abbildung 16: Reaktivität funktioneller Anti-AT <sub>1</sub> R-Antikörper bei der limitierten und der diffusen Form der SSc .....	83
Abbildung 17: Analyse des Zusammenhangs zwischen der Reaktivität von Anti-AT <sub>1</sub> R-Antikörpern und der Krankheitsdauer bei Patienten mit SSc .....	84
Abbildung 18: Reaktivität von Anti-AT <sub>1</sub> R-Antikörpern bei 73 SSc-Patienten in Relation zur Anzahl an Organmanifestationen.....	86
Abbildung 19: Reaktivität funktioneller Anti-AT <sub>1</sub> R-Antikörper bei SSc-Patienten mit und ohne Hautmanifestationen.....	87
Abbildung 20: Reaktivität funktioneller Anti-AT <sub>1</sub> R-Antikörper bei SSc-Patienten mit und ohne Calcinosis .....	88
Abbildung 21: Reaktivität funktioneller Anti-AT <sub>1</sub> R-Antikörper bei SSc-Patienten mit und ohne Lungenmanifestation .....	88
Abbildung 22: Reaktivität funktioneller Anti-AT <sub>1</sub> R-Antikörper bei SSc-Patienten mit und ohne pulmonal-arterielle Hypertonie.....	89
Abbildung 23: Reaktivität funktioneller Anti-AT <sub>1</sub> R-Antikörper bei SSc-Patienten mit und ohne ösophageale Manifestation.....	89
Abbildung 24: Reaktivität funktioneller Anti-AT <sub>1</sub> R-Antikörper bei SSc-Patienten mit und ohne Myositis.....	90
Abbildung 25: Reaktivität funktioneller Anti-AT <sub>1</sub> R-Antikörper bei SSc-Patienten mit und ohne Sicca-Symptomatik.....	90
Abbildung 26: Reaktivität funktioneller Anti-AT <sub>1</sub> R-Antikörper bei SSc-Patienten mit und ohne Herzmanifestation.....	91
Abbildung 27: Reaktivität funktioneller Anti-AT <sub>1</sub> R-Antikörper bei SSc-Patienten mit und ohne digitale Ulzera.....	91
Abbildung 28: Reaktivität stimulierender und inhibierender Anti-AT <sub>1</sub> R-Antikörper vor und nach aHSZT bei Patienten mit SSc.....	93
Abbildung 29: Verlauf der Reaktivität funktioneller Anti-AT <sub>1</sub> R-Antikörper nach einer aHSZT bei Patienten mit SSc.....	94
Abbildung 30: Luciferase-Assay mit CHO-K1-Zellen und aufsteigenden Angiotensin-II-Konzentrationen .....	96
Abbildung 31: Luciferase-Assay mit Huh-7-Zellen und aufsteigenden Angiotensin-II-Konzentrationen .....	97

Abbildung 32: Luciferase-Assay mit den Transfektionsreagenzien FuGene 6™ und ViaFect™ .....	98
Abbildung 33: Vergleich der Transfektionsreagenzien FuGene 6™ und ViaFect™ im Luciferase-Assay .....	99
Abbildung 34: Validierung des Luciferase-Assays mit AT <sub>1</sub> R/pGL3-NFAT-co- transfizierten CHO-K1-Zellen mittels Losartan.....	100
Abbildung 35: Ermittlung der optimalen Immunglobulin-Verdünnung für das Luciferase-Assay mit AT <sub>1</sub> R/pGL-NFAT-co-transfizierten CHO-K1-Zellen.....	101
Abbildung 36: Vergleich des Luciferase-Assays mit dem AT <sub>1</sub> R-Assay .....	102
Abbildung 37: Korrelationsanalyse des Luciferase- und des AT <sub>1</sub> R-Assays ....	103
Abbildung 38: Korrelationsanalyse der beiden Assays mit Seren von stammzelltransplantierten SSc-Patienten .....	104

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Sklerodermie-Klassifizierungssystem aus dem Jahre 1980, entwickelt vom American College of Rheumatology [10] .....	12
Tabelle 2: ACR/EULAR-Klassifikationskriterien zur Diagnosestellung einer SSc aus dem Jahre 2013 [11].....	14
Tabelle 3: Epidemiologie der Unterformen der SSc [14].....	17
Tabelle 4: Anteil der Organbeteiligungen bei Unterformen der SSc [14] .....	21
Tabelle 5: Anteil der SSc-spezifischen Autoantikörper bei Organbeteiligung der SSc [7].....	28
Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Patientenseren.....	44
Tabelle 7: Klinische Parameter der 73 SSc-Patienten .....	44
Tabelle 8: Proteinbestimmung nach Bradford .....	76
Tabelle 9: Prävalenz von stimulierenden und inhibierenden Antikörpern gegen den AT <sub>1</sub> R in Immunglobulinen von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen .....	77
Tabelle 10: Receiver-Operating-Characteristics-Analyse der funktionell aktiven Anti-AT <sub>1</sub> R-Antikörper von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen verglichen mit denen gesunder Probanden.....	80
Tabelle 11: Prävalenz von stimulierenden und inhibierenden Antikörpern gegen den AT <sub>1</sub> R in Patienten mit SSc und verschiedenen Organmanifestationen.....	85
Tabelle 12: Prävalenz stimulierender und inhibierender Anti-AT <sub>1</sub> R-Antikörper vor und nach aHSZT bei Patienten mit SSc.....	92

## Abkürzungsverzeichnis

Aak	Autoantikörper
ACA	Anti-Centromer-Antikörper
ACR	American College of Rheumatology
AEZAK	Anti-Endothelzell-Antikörper
aHSZT	autologe hämatopoetische Stammzelltransplantation
AID	<i>autoimmune disease</i> (Autoimmunkrankheit)
AKV	Antikörper-Verdünnungspuffer
ANA	antinukleäre Autoantikörper
AS	Ammoniumsulfat
AT <sub>1</sub> R	Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptor
ATA	Anti-Topoisomerase-I-Autoantikörper / Anti-Scl-70-Autoantikörper
ATII	Angiotensin II
AUC	<i>Area under the curve</i>
BA	Bewegungsapparat
BL	Blockierlösung
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
dcSSc	diffuse kutane Systemische Sklerose
DNSS	Deutsches Netzwerk für Systemische Sklerose
ET-1	Endothelin-1
ET <sub>A</sub> R	Endothelin-Typ-A-Rezeptor
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
FCS	fetales Kälberserum
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
GFP	<i>green fluorescence protein</i>
GIT	Gastrointestinal-Trakt
GP	gesunde Probanden
GPKR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
h-CT	hochauflösende Computertomographie

HBSS	<i>Hanks-Balance-Salt-Solution</i>
HMEC-1	menschliche mikrovaskuläre Endothelzellen
ICAM-1	<i>intracellular adhesion molecule 1</i>
Ig	Immunoglobulin
ILD	interstitielle Lungenerkrankung
lcSSc	limitierte kutane Systemische Sklerose
ISSc	limitierte Systemische Sklerose
mAChR3	muskarinischer Acetylcholinrezeptor M3
MCP	Metacarpophalangealgelenken
MCTD	<i>mixed connective tissue disease</i>
MG	Melon Gel
MMP-1	Matrixmetalloproteinase 1
mRSS	modifizierter Rodnan-Skin-Score
MW	Mittelwert
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cell</i>
Overlap-S	Overlap-Syndrom
PAH	pulmonal-arterielle Hypertonie
PBC	primär biliäre Cholangitis
PDE5I	Phosphodiesterase-5-Inhibitoren
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PDGFR	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>
PM	Polymyalgia rheumatica
POL3	RNA-Polymerase III
PSC	primär sklerosierende Cholangitis
RA	rheumatoide Arthritis
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RLU	relative Lichteinheit
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RP	Raynaud-Phänomen
ssScl	<i>Sclerosis sine scleroderma</i>

SDS	Natriumdodecyl-Sulfat
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFM	serumfreies Medium
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SS	Sjögren-Syndrom
SSc	Systemische Sklerose
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
TGF-beta	<i>transforming growth factor beta</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of MMP</i>
U1-RNP	U1-ribonukleäres Protein
U3-RNP	Fibrillarin
UndScl	undifferenzierte Sklerodermie
VCAM-1	<i>vascular adhesion molecule 1</i>
VEGF	<i>vascular-endothelial growth factor</i>
WP	Waschpuffer

# 1 Einleitung

## 1.1 Systemische Sklerose

Die Systemische Sklerose (SSc) ist eine chronisch progrediente rheumatische Autoimmunerkrankung (AID), die dem Formenkreis der Kollagenosen zugeordnet wird. Zu einer Fibrosierung des Bindegewebes, der Haut und der inneren Organe kommt es aufgrund einer Fibroblastendysfunktion. Zusätzlich spielen neben der Mikroangiopathie mit Hypoxämie auch eine Immunsystemdysregulation eine pathologisch-pathogenetische Rolle in der Entstehung der SSc [1]. Die SSc wird klinisch anhand von Autoantikörperprofilen, Symptomatik und Prognose in die limitierte kutane Form (lcSSc), die diffuse kutane Form (dcSSc) und die limitierte Systemische Sklerose (lSSc) eingeteilt [2]. Ferner werden auch die *Sclerosis sine scleroderma* und das Sklerodermie-Overlap-Syndrom der SSc zugeordnet, wobei es zu Mischformen von SSc mit weiteren rheumatischen Erkrankungen, beispielsweise dem Sjögren-Syndrom (SS) und dem Systemischen Lupus erythematodes (SLE), kommt [3].

### 1.1.1 Historie des Begriffs

Der Begriff ‚Sklerodermie‘ setzt sich aus den zwei griechischen Wörtern ‚skleros‘ (‚hart‘) und ‚derma‘ (‚Haut‘) zusammen, welche übersetzt ‚harte Haut‘ bedeuten [4].

Bereits in der Antike beschrieb Hippokrates (460–370 v. Chr.) in seinem Werk „De Epidermidis“ einen Patienten, dessen Haut so hart war, dass es nicht möglich war, diese in Falten zu legen. Konkreter wurde es im Werk „De sanitate tuenda“ von Galen (131–201 n. Chr.) dargelegt. In diesem Werk beschrieb Galen eine Haut, die weiß und verdickt ist und bei starker Arbeit nicht schwitzt [4]. Weitere Berichte von Oribasius (325–403 n. Chr.), Aetius von Amida (6. Jh. n. Chr.), Paulus Aegineta (625–690 n. Chr.) und Avicenna (980–1036 n. Chr.) enthalten Darstellungen von Hautkrankheiten, die mit dem Systemkomplex der SSc vereinbar sind [5]. Eine definitive Zuordnung zur SSc anhand der Schriften ist jedoch angesichts der eher ungenauen Beschreibungen schwierig, wenn nicht sogar unmöglich [5].

Im Jahre 1755 formulierte Curzio die erste überzeugende Beschreibung der SSc in seiner Arbeit [5], die aber inzwischen angezweifelt wird, da es sich wahrscheinlich um eine *Scleroedema adultorum* handelte [6]. Thirial (1845) bezeichnete die SSc als ‚*sclerème des adultes*‘ und gilt damit heute als Erstbeschreiber der Erkrankung. Im Jahre 1865 gab Koebner der Erkrankung den deutschen Begriff ‚Sklerodermie‘ [4].

Duhring differenzierte im Jahre 1881 als erster die diffuse Sklerodermie von der zirkumskripten Sklerodermie. Nachdem festgestellt worden war, dass die Sklerodermie nur eine kutane Manifestation einer generalisierten Krankheit ist, sprach sich Goetz im Jahre 1945 für die Einführung des Terminus ‚Progressive Systemische Sklerose‘ aus [5]. Dieser Begriff wird heute aufgrund der Annahme, dass eine dcSSc nicht in jeder Situation progressiv fortschreitet, nicht empfohlen [7]. Die Trennung zwischen lcSSc und dsSSc wurde im Jahre 1988 von LeRoy vorgeschlagen und hat bis heute Bedeutung [8]. Zusätzlich differenzierten LeRoy und Medsger im Jahre 2001 die ISSc, eine frühe klinische Form der SSc [2].

### 1.1.2 Klassifikation

Anhand von Klassifikationskriterien werden fünf Verlaufsformen der SSc unterschieden. Die dcSSc und die lcSSc mit ihrer frühen klinischen Form der ISSc sind die zwei häufigsten Formen der SSc. Das *Overlap Syndrome*, die undifferenzierte Sklerodermie und die *Sclerosis sine scleroderma* sind deutlich seltener [9].

Im Jahre 1980 veröffentlichte das American College of Rheumatology (ACR) Kriterien zur Klassifizierung von Patienten mit etablierter SSc. Dabei gibt es ein Hauptkriterium und drei Nebenkriterien. Zur Diagnosestellung einer SSc müssen ein Hauptkriterium oder mindestens zwei Nebenkriterien erfüllt sein [10].

**Tabelle 1: Sklerodermie-Klassifizierungssystem aus dem Jahre 1980, entwickelt vom American College of Rheumatology [10]**

Hauptkriterium	Nebenkriterien
Dermatosklerose proximal der Fingergelenke	Sklerodaktylie



	Fingerspitzenulzera bzw. Verlust des Subcutangewebes der Fingerspitzen
	bilaterale basale Lungenfibrose

Aufgrund heterogener Verläufe der SSc wurde im Jahre 1988 ein weiteres Klassifikationssystem von LeRoy eingeführt [8], das 2001 in Zusammenarbeit mit Medsger überarbeitet wurde [2]. Es differenziert zwischen ISSc, lcSSc, dcSSc, *Sclerosis sine scleroderma* und *Overlap Syndrome* anhand von Antikörperprofilen, Organmanifestationen und Krankheitsverläufen. Die ISSc ist eine frühe Form der lcSSc, bei der es unter Ausbleiben einer Hautsklerosierung zu SSc-typischen Symptomen wie dem Raynaud-Phänomen (RP) oder SSc-typischen Autoantikörperprofilen kommt. Die lcSSc ist definiert als eine sich auf das Gesicht und auf die Bereiche distal von Ellenbogen und Kniegelenk beschränkende Hautsklerosierung, wohingegen die Hautsklerosierung bei der dcSSc das Gesicht, den Körperstamm und die Bereiche proximal von Ellenbogen und Kniegelenk betrifft. Die *Sclerosis sine scleroderma* wird anhand von SSc-typischen serologischen Parametern und Organmanifestationen, jedoch unter ausbleibender Hautsklerosierung definiert. Patienten mit typischen Zeichen einer SSc und begleitenden rheumatischen Erkrankungen weisen laut LeRoy und Medsger das *Overlap Syndrome* auf [2].

Zur Verbesserung der Sensitivität und Spezifität von Klassifizierungssystemen, insbesondere in früheren Stadien der SSc, entwickelte die European League Against Rheumatism (EULAR) im Jahre 2013 zusammen mit dem ACR das EULAR-Klassifikationssystem, das weitere klinische Merkmale wie Teleangiectasien, das Raynaud-Syndrom und die Kapillarmikroskopie beinhaltet. Die EULAR-Klassifikation ist jedoch nicht bei Patienten mit SSc-ähnlichen Verläufen oder bei nicht vorhandener Hautsklerose außerhalb der Finger anzuwenden. Die Gesamtpunktzahl der in Tabelle 2 aufgezählten Kriterien wird durch Addition des maximalen Scores in jeder Kategorie ermittelt. Patienten mit einem Gesamtscore von mindestens 9 wird eine SSc diagnostiziert [11].

**Tabelle 2: ACR/EULAR-Klassifikationskriterien zur Diagnosestellung einer SSc aus dem Jahre 2013 [11]**

<b>Item</b>	<b>Sub-Item(s)</b>	<b>Gewichtung</b>
Verdickung der Haut der Finger beider Hände, die sich proximal zu den Metacarpophalangealgelenken (MCP) erstreckt (hinreichendes Kriterium)		9
Hautverdickung an den Fingern (nur die höhere Punktzahl)	geschwollene Finger	2
	Sklerodaktylie der Finger (distal zu den MCP, aber proximal zu den proximalen Interphalangealgelenken)	4
Läsionen an den Fingerspitzen (nur der höhere Score)	digitale Geschwüre an der Fingerspitze	2
	Lochfraß-Narben an den Fingerspitzen	3
Teleangiektasie		2
abnormale Nagelfalzkapillaren		2
pulmonal-arterielle Hypertonie und/oder interstitielle Lungenerkrankung (maximale Punktzahl: 2)	PAH	2
	ILD	2
RP		3
SSc-bezogene Autoantikörper	Anti-Centromer-Antikörper	3
	Anti-Topoisomerase-Antikörper	
	Anti-RNA-Polymerase III	

Ab einem Gesamtscore von 9 Punkten kann eine manifeste SSc diagnostiziert werden [11]. PAH: pulmonal-arterielle Hypertonie, ILD: interstitielle Lungenerkrankung, RP: Raynaud-Phänomen

### **1.1.3 Verlaufsformen**

Im Verlauf der dcSSc kommt es zur Hautsklerosierung am Körperstamm, im Gesicht und in Bereichen proximal von Ellenbogen und Kniegelenken. Typische klinische Merkmale der dcSSc sind der Nachweis von Sehnenabrieb und Kapillardestruktion im Bereich des Nagelfalzes. Neben generalisierten Ödemen und der Beteiligung innerer Organe ist ein rascher Progress charakteristisch. Definitionsgemäß kommt es innerhalb eines Jahres nach dem Auftreten des RP zu einer stammbetonten Sklerose und Organbeteiligungen. Ein typisches Antikörperprofil der dcSSc ist das Vorhandensein von Anti-Scl-70-Antikörpern, die bei ca. 40 % der dcSSc-Patienten unter Abwesenheit von Anti-Centromer-Antikörpern (ACA) nachweisbar sind [8, 12-14].

Die lcSSc ist durch eine Hautsklerose der distalen Extremitäten, Kopf und Hals charakterisiert und hat verglichen mit der dcSSc eine langsame Progression. Patienten leiden oftmals schon viele Jahre vor dem Auftreten einer Hautsklerose an einem RP. Früher wurde die lcSSc als ‚CREST-Syndrom‘ bezeichnet, da es häufig zu *Calcinosis cutis*, RP, einer Ösophagusbeteiligung, Sklerodaktylien und Teleangiektasien kommt. Diese Nomenklatur wird jedoch nicht mehr empfohlen, da das CREST-Syndrom die lebensbedrohliche Komplikation der pulmonalen arteriellen Hypertonie (PAH), die bei 20 % der lcSSc-Patienten auftritt, nicht beinhaltet [7]. Kennzeichnend für die lcSSc ist neben den klinischen Symptomen und der langsamen Progression das Antikörperprofil. In diesem sind ACA unter Abwesenheit von Anti-Scl-70-Antikörpern nachweisbar [8, 12-14].

Eine seltenere Unterform der Sklerodermie ist das *Overlap Syndrome*, das in der Literatur teilweise auch als ‚Mischkollagenose‘ bezeichnet wird. Charakteristisch ist eine SSc mit Symptomen einer weiteren rheumatischen Erkrankung wie Polymyositis, M. Sharp, M. Sjögren und SLE. Anti-U1-RNP- und Anti-PM-SCL-Antikörper sind charakteristisch für diese Unterform der Sklerodermie [3, 14-16].

Die Diagnose einer undifferenzierten Sklerodermie (UndScl) wird bei Patienten gestellt, die typische Charakteristika einer SSc zeigen, die Kriterien einer SSc-Diagnose jedoch nicht erfüllen [14, 17].

Eine weitere Unterform der SSc ist die *Sclerosis sine scleroderma*. Bei deren Auftreten kommt es zu lcSSc-typischen Symptomen wie dem RP und der PAH, zudem können lcSSc-typische Autoantikörper (Aak) serologisch nachgewiesen werden. Eine Hautsklerose kann jedoch nicht nachgewiesen werden [8, 18]. Die Kategorisierung der *Sclerosis sine scleroderma* als eigenständige Unterform wird nicht einheitlich anerkannt, teilweise wird diese als eine Frühform der limitierten SSc beschrieben [18, 19].

#### **1.1.4 Epidemiologie**

Die SSc ist eine seltene AID, die überwiegend Frauen betrifft. Aufgrund von geschlechtsspezifischer, geographischer und ethnischer Variabilität kommt es regional zu unterschiedlichen Prävalenzen und Inzidenzen. Abhängig von methodischen, genetischen und ethnischen Unterschieden wird die jährliche Inzidenz auf 0,6 bis 19 Fälle pro eine Million Einwohner geschätzt [14, 20]. Die Prävalenzen schwanken zwischen 31 Patienten (1985–1986) pro eine Million Einwohner in West Midlands England [21] und 286 Patienten pro eine Million Einwohner in South Carolina (USA) [22]. Aus den Daten des Deutschen Netzwerks für Systemische Sklerose (DNSS) ergibt sich eine Prävalenz von 22,5 pro eine Million Einwohner für Deutschland [15]. Die Erstmanifestation geschieht in Deutschland in einem Alter zwischen 42 und 69 Jahren [14]. Männer sind zum Zeitpunkt der Diagnosestellung jünger ( $53,9 \pm 12,4$  Jahre) als Frauen ( $56 \pm 13,9$  Jahre) (siehe Tabelle 3) [14]. Das Risiko zu erkranken ist bei Frauen signifikant höher als bei Männern. Das Verhältnis schwankt regional zwischen 3 : 1 in Allegheny County, Pennsylvania (USA) [23] und 14 : 1 in Tokio (Japan) [24]. In Deutschland und Österreich ist die Prävalenz laut dem Deutschen Netzwerk für Rheumatologie bei Frauen ca. fünfmal höher als bei Männern [14].

Neben geschlechtsspezifischen Prävalenzen sind auch ethnische Unterschiede bekannt: In der schwarzen Bevölkerung liegt die Prävalenz höher als in der weißen. Zudem ist das Durchschnittsalter bei der schwarzen Bevölkerung zum Diagnosezeitpunkt signifikant niedriger als bei der weißen. Verglichen mit der weißen Bevölkerung ist die Wahrscheinlichkeit, an einer dcSSc zu erkranken, für die schwarze Bevölkerung fast doppelt so hoch [25].

Eine positive Familienanamnese ist bis heute der stärkste Risikofaktor für eine SSc-Erkrankung. Studien haben gezeigt, dass 17,2 % der diagnostizierten SSc Patienten eine positive Familienanamnese aufweisen (siehe Tabelle 3). Das absolute Risiko für Familienmitglieder, an einer SSc zu erkranken, liegt jedoch unter 1 % [14]. Die Fünf-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit liegt bei 60 bis 80 % [15].

**Tabelle 3: Epidemiologie der Unterformen der SSc [14]**

	<b>lcSSc</b>	<b>dcSSc</b>	<b>Over- lap-S</b>	<b>UndSci</b>	<b>ssSci</b>
Frauen	87,7	76,1	84,2	84,3	90,9
Männer	12,2	23,9	15,8	15,7	9,1
familiäre Historie	20,2	23,5	25,8	24,1	18,8
Alter (Mittelwert) in Jahren	58,5 ± 12,7	54,1 ± 14,1	50,9 ± 13,5	54,7 ± 12,5	54,1 ± 15,8

Die Werte sind, abgesehen vom Alter, in Prozent dargestellt. lcSSc: limitierte kutane systemische Sklerose, dcSSc: diffuse kutane systemische Sklerose, Overlap-S: *Overlap-Syndrome*, UndSci: Undifferenzierte systemische Sklerose, Scss: *Sclerosis sine scleroderma*

### **1.1.5 Ätiopathogenese**

#### **1.1.5.1 HLA-Gene**

In Studien konnten Allele der HLA-Klasse II identifiziert werden, die mit der SSc oder mit SSc-typischen Aak-Profilen korrelieren. Assoziationen zwischen Allelen der HLA-Klasse I und der SSc oder deren Sub-Phänotypen wurden bisher nicht beschrieben [26]. Die Haplotypen der Klasse II DRB1\*1104, DQA1\*0501, DQB1\*0301 und DQB1-Allele, die einen Nicht-Leucin-Rest an Position 26 kodieren (DQB1 26 epi) sind am stärksten mit weißen und hispanischen SSc-Probanden assoziiert. Die Haplotypen DRB1\*0701, DQA1\*0201, DQB1\*0202 und DRB1\*1501 korrelieren negativ und sind möglicherweise schützend. Die Allele DRB1\*0804, DQA1\*0501 und DQB1\*0301 kommen vermehrt bei schwarzen Probanden mit der SSc vor [27]. Auch konnten Autoantikörperprofilen von SSc-Patienten mit HLA-Haplotypen nachgewiesen werden. Der HLA-DQB1\*0501/HLA-DRB1\*0101-Haplotyp ist mit der Bildung von ACA [27-29] assoziiert, die HLA-

DRB1\*1104-Haplotypen [28] und die HLA-DPB1\*1301-Haplotypen sind mit der Bildung von Anti-Topoisomerase-I-Autoantikörpern (ATA) verknüpft [30].

#### 1.1.5.2 Pathogenese

Die Pathogenese der SSc ist bis heute nicht ausreichend geklärt. Dem Pathomechanismus der SSc werden jedoch eine Entzündungsreaktion, die Überproduktion von Kollagen, die Schädigung von Gefäßen und eine Störung der Immunmodulation zugeschrieben [31].

Eine von inflammatorischen Mediatoren gesteuerte Dysregulation von Fibroblasten führt zu einer überschießenden Produktion von extrazellulärer Matrix, was eine Fibrose und eine Organdysfunktion zur Folge hat [31]. Für eine Vielzahl von Mediatoren konnte eine profibrotische Wirkung auf Fibroblasten nachgewiesen werden. Dem Zytokin *transforming growth factor beta* (TGF-beta) wird eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Fibrose zugeordnet. TGF-beta moduliert eine vermehrte Transkription von Kollagen Typ I und *tissue inhibitor of MMP* (TIMP). Ferner vermindert TGF-beta die Transkription von Matrixmetalloproteinase 1 (MMP-1), die als Mediator im Abbau von Kollagen wirkt und durch TIMP gehemmt wird, was die Fibrosierung zusätzlich verstärkt. Es wird angenommen, dass TGF-beta zusammen mit dem ‚*connective tissue growth factor*‘-Gen (einem TGF-beta-regulierenden Gen) und Endothelin-1 mit seiner vasokonstriktorischen Wirkung eine anhaltende Aktivierung von Fibroblasten induziert [32, 33].

Bereits im frühen Verlauf der SSc kommt es zu vaskulären Dysfunktionen, die auf das Ungleichgewicht zwischen Vasodilatation und Vasokonstriktion zurückzuführen sind. Gesteuert wird dies durch neuronale und endotheliale Mediatoren [31]. Aufgrund dieses Ungleichgewichts kommt es zur Hypoxie des Gewebes mit anschließender Reperfusion-Ischämie und oxidativem Gewebestress. Die Veränderungen können zu einer erhöhten mikrovaskulären Permeabilität führen oder die Folge früherer pathologischer Ereignisse sein. Ausgehend davon kommt es zu einer verstärkten Leukozytenrekrutierung, die zu Endothelzellschädigung und Thrombosen führt. Durch die Freilegung subendothelialer Strukturen gegenüber Thrombozyten werden diese aktiviert und setzen Mediatoren wie den *platelet derived growth factor* (PDGF) frei [31, 34]. PDGF ist ein Mediator, der an der

Rekrutierung von Fibroblasten und Perizyten und deren Transdifferenzierung zu Myofibroblasten beteiligt ist, was vermutlich zu einem fibroproliferativen Ereignis beiträgt [31, 33]. Es wird zudem vermutet, dass die Angiogenese bei der SSc, aufgrund einer Überexpression des *vascular-endothelial growth factor* (VEGF), durch eine verminderte Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen zu Endothelzellen und eine verminderte Funktion von Endothelvorläuferzellen beeinträchtigt wird [31, 35, 36].

In histologischen Untersuchungen früherer SSc-Hautläsionen konnte gezeigt werden, dass der Entwicklung von Vaskulopathien und Fibrosen ein entzündliches Infiltrat vorausgeht [37]. Interessanterweise war die Kollagensynthese von Fibroblasten in situ erhöht, wenn diese an Entzündungszellen grenzten [38, 39]. Dieser Ansatz führte zu der Hypothese, dass Entzündungszellen, insbesondere T-Zellen, zu einer zytokingesteuerten Stimulation von Fibroblasten führen [31]. Der Nachweis von regulatorischen- und CD8+ T-Zellen lässt darauf schließen, dass die Immunmodulation zur Pathogenese insbesondere in der Frühphase beiträgt [33]. In Studien wurden T-Zellen, die im Rahmen einer SSc in betroffene Organe eingewandert sind, analysiert. Dabei wurden T-Zellen mit unterschiedlichen Genexpressionsmustern für Mediatoren identifiziert [40, 41]. Die Heterogenität der T-Zellen lässt sich möglicherweise auf unterschiedliche Phasen der Krankheitsentstehung zurückführen. Dennoch wird angenommen, dass überwiegend Interleukin-4-produzierende Th2-Zellen die Kollagenablagerung durch Fibroblasten stimulieren [42-44]. Weiterführend wurden im peripheren Blut und in der Haut von SSc-erkrankten Frauen Th2-orientierte männliche T-Nachkommenzellen gegen mütterliche MHC-Antigene nachgewiesen. Dies lässt vermuten, dass Mikrochimärismus zur Pathogenese der SSc in Form einer *Graft-versus-Host-Disease*-ähnlichen Erkrankung beiträgt [45]. Die Tatsache, dass in der weiblichen Bevölkerung nach der Reproduktionsphase die höchste Prävalenz an SSc Patienten zu finden ist, unterstützt die Hypothese des Mikrochimärismus zusätzlich. Bis heute konnte dem Mikrochimärismus jedoch keine kausale Rolle in der Pathogenese zugeordnet werden [33].

Die Aufgaben der B-Zellen sind breit gefächert: B-Zellen präsentieren Antigene, produzieren Zytokine und Antikörper und dienen der lymphatischen Organogenese. Außerdem induzieren sie die Differenzierung von T-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen. Bei 90 % der SSc-Patienten sind Aak vorhanden, die mit krankheitsspezifischen Manifestationen korrelieren. Daher ist es naheliegend, dass Plasmazellen und ihre Vorläuferzellen, die B-Zellen, eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der SSc spielen. Das breite Regulationsspektrum der B-Zellen und deren Kernrolle bei der Entstehung einer SSc legt nahe, dass nicht nur die Produktion von Aak, sondern auch weitere Mechanismen zur Induktion einer AID führen [46]. Tedder et al. (2005) konnten eine chronische Aktivierung, eine klonale Expansion und die vermehrte Antikörperproduktion von B-Zellen bei Patienten mit SSc nachweisen [47]. Auch wurden erhöhte Spiegel des B-Zell-Aktivierungsfaktors im Plasma von SSc-Patienten festgestellt [48]. Verglichen mit gesunden Probanden (GP) konnte bei Patienten mit SSc eine signifikant höhere Expression von CD19 auf B-Zellen identifiziert werden [49]. Die Überexpression von CD19 wurde nicht nur bei naiven B-Zellen, sondern auch bei B-Gedächtniszellen beobachtet [50]. Folglich kommt es zu einer chronischen Aktivierung der Gedächtniszellen mit erhöhter IgG-Produktion, was möglicherweise zur Bildung von Aak führen kann [46]. Zudem konnte gezeigt werden, dass aktivierte B-Zellen vermehrt TGF-beta produzieren und somit zur Induktion einer Fibrose beitragen [51]. Die beschriebenen Beobachtungen deuten auf eine chronische B-Zell-Aktivierung hin, die für die Entwicklung und das Fortschreiten der Erkrankung entscheidend ist.

Außerdem tragen funktionelle Aak gegen verschiedene Strukturen möglicherweise zum Pathomechanismus der SSc bei. Diese werden in Kapitel 1.1.8 näher beschrieben.

### **1.1.6 Organmanifestationen**

Die SSc ist eine Erkrankung der Haut, die sich zusätzlich an inneren Organen manifestiert. Abhängig von der Verlaufsform sind unterschiedliche Organe vermehrt oder zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Erkrankung betroffen. Die inneren Organe, die am häufigsten betroffen sind, sind Lunge, Niere, Ösophagus und



Herz (siehe Tabelle 4). Die Patienten haben zudem ein erhöhtes Risiko für maligne Erkrankungen der Lunge, Leber und Blase sowie des blutbildenden Systems [52].

**Tabelle 4: Anteil der Organbeteiligungen bei Unterformen der SSc [14]**

	<b>lcSSc</b>	<b>dcSSc</b>	<b>Overlap-S</b>	<b>UndSci</b>	<b>ssSci</b>
Raynaud-Phänomen	96,3	94,2	95,9	89,3	95,5
Hautbeteiligung	91,5	97,6	82,3	60	63,6
PAH	14,9	18,5	8,2	4,1	13,6
pulmonale Fibrose	20,8	56,1	30,6	18,2	59,1
Ösophagus	59,2	69,3	61,2	35,5	72,7
Magen	15,3	15,6	14,3	8,3	27,3
Darm	6,1	5,3	5,4	7,4	18,2
Niere	9,1	15,9	6,1	8,3	22,7
Herz	12	23	10,2	8,3	13,6
muskuloskelettales System	44,9	56,6	67,6	44,6	45,5
Nervensystem	4,1	7,1	10,3	6,6	4,5
Sicca-Syndrom	43,5	39,7	38,9	43,3	45,5
Kauorgane	23,7	34,1	24,4	18,5	15

Werte sind in Prozent angegeben. lcSSc: limitierte kutane Systemische Sklerose, dcSSc: diffuse kutane Systemische Sklerose, Overlap-S: Overlap-Syndrom, UndSci: undifferenzierte Systemische Sklerose, ssSci: *Sclerosis sine scleroderma*, PAH: pulmonale arterielle Hypertonie

#### 1.1.6.1 Lunge

Die Lunge ist nach dem Gastrointestinaltrakt (GIT) das am zweithäufigsten in Verbindung mit der SSc befallene innere Organ [14]. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zur interstitiellen Lungenerkrankung (ILD) und PAH. Eine Differenzierung zwischen ILD und PAH ist aufgrund der hohen Kodominanz der beiden Erkrankungen schwierig [53]. Ferner leiden SSc-Patienten aufgrund einer ösophagealen Dysmotilität vermehrt unter Aspirationspneumonien und Bronchiektasen. Zudem geht die SSc mit einem erhöhten Risiko einher, an einem Lungenkarzinom zu erkranken [53].

Die SSc-assoziierte ILD steht in Zusammenhang mit einer schlechten Prognose und ist die häufigste Todesursache in Verbindung mit der SSc [54, 55]. Rund 80 % der SSc-Patienten entwickeln im Verlauf ihrer Erkrankung eine ILD [55, 56]. Ursächlich dafür ist das Zusammenspiel aus chronischer Inflammation, Epithel- und Gefäßverletzung und einer Zunahme des Bindegewebes, was letztendlich eine Lungenfibrose zur Folge hat. Verglichen mit der idiopathischen ILD ist die SSc-assoziierte ILD durch eine höhere Dichte von Kollagenfasern im septalen Interstitium und elastischen Fasern entlang des septalen Interstitiums gekennzeichnet [53]. Folglich leiden die Patienten unter einer restriktiven Ventilationsstörung mit einer verminderten Diffusionskapazität. Das vitale und das totale Lungenvolumen sind, wie auch die Lungenventilation, aufgrund einer verstärkten Lungenrestriktion vermindert. Klinisch zeigt sich dies in Form von Dyspnoe, Leistungsminderung, Zyanose, Tachykardie und Rechtsherzinsuffizienz. Im weiteren Verlauf kommt es aufgrund der chronischen Hypoxie zu Trommelschlägelfingern. Risikofaktoren für die Entwicklung einer ILD sind die dcSSc und der Nachweis von Anti-Scl-70-Antikörpern [8, 57].

Eine mit SSc assoziierte PAH kann isoliert oder in Kombination mit einer ILD auftreten. Bei der PAH sind vor allem die kleinen Lungenarterien betroffen, was zu einem Anstieg des pulmonalen vaskulären Widerstandes führt. Im Verlauf leiden die Patienten unter einem Rechtsherzversagen, das schlussendlich zum Tod führt [58]. Die Ursachen einer SSc-assoziierten PAH sind noch nicht ausreichend geklärt. Störungen in den Signalwegen von Endothelin 1, NO und Prostazyklin konnten bislang als Ursachen identifiziert werden [53]. Die Prävalenz einer PAH lag in einer Studie von Hachulla et al. bei 7,85 % [58]. Klinisch zeigt sich eine PAH durch unspezifische Symptome wie Dyspnoe, Abgeschlagenheit, Ermüdung, Thoraxschmerzen, Ödeme und einen erweiterten Bauchumfang [59]. Sekundär kann eine PAH zusätzlich zu einer schweren Lungenfibrose, Nierenkrise oder Kardiomyopathie führen, was vermehrt bei Patienten mit dcSSc auftritt [60]. Eine SSc-assoziierte PAH weist verglichen mit einer idiopathischen PAH eine erhöhte Mortalität auf. Die geschätzte Ein-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit beträgt bei einer SSc-assoziierten PAH 55 %, bei einer idiopathischen PAH

84 %, was die Wichtigkeit einer frühzeitigen Diagnostik unterstreicht [61]. Die lcSSc und ACA sind Risikofaktoren in der Entwicklung einer PAH [57, 60].

#### 1.1.6.2 Nieren

Eine Nierenbeteiligung verläuft bei einer Vielzahl der SSc-Patienten asymptomatisch [62]. Bei ca. 20 % der SSc-Patienten kommt es zu einer Nierenbeteiligung. Ursächlich für die Nierenschädigung sind progressive mikroangiopathische Veränderungen in interlobulären Arterien und Arteriolen, die zu einer funktionellen Einschränkung der Niere führen [63]. Klinisch kommt es zu einer Hypertonie und einer renalen Krise. Weitere sekundäre Symptome sind die hypertensive Retinopathie, Enzephalopathie, Myokarditis, Perikarditis und Arrhythmien [63-65]. Durch die Einführung von *Angiotensin-Converting-Enzyme*-Hemmern konnte die Mortalität drastisch gesenkt werden [66]. Die Behandlung der SSc mittels D-Penicillaminen gilt heute als obsolet [67], da ca. 20 % der Patienten unter der Therapie eine reversible glomeruläre Nephritis und Proteinurie mit einer Mortalität von 40 % entwickelten [68, 69]. Risikofaktoren dafür sind der Nachweis von Anti-Polymerase-III-Antikörpern, eine verstärkte Hautbeteiligung und die dcSSc, wobei es aber auch bei der lcSSc zu einer Beteiligung der Nieren kommen kann [70].

#### 1.1.6.3 Herz

Eine primäre Herzbeteiligung ist vermehrt mit der dcSSc assoziiert und hat eine Prävalenz von 23 % bei der dcSSc bzw. 12 % bei der lcSSc [14]. In einer Studie von Hunzelmann et al. aus dem Jahre 2008 konnte bei 50 % aller autopsierten SSc-Patienten eine Beteiligung des Herzens diagnostiziert werden [71]. Pathophysiologisch induziert eine Fibrosierung des Endo- und Myokards eine eingeschränkte linksventrikuläre Funktion, eine Erregungsleitungsstörung und eine verminderte diastolische Relaxation. Eine eingeschränkte diastolische Relaxation findet sich gehäuft bei SSc-Patienten mit PAH und korreliert mit einer erhöhten Mortalität und Tod durch Rechtsherzversagen [71]. Häufige klinische Symptome sind Belastungsdyspnoe, Palpitationen [71], Brustschmerzen und Synkopen [14]. Renale Krisen und eine PAH führen sekundär zu einer signifikanten kardialen Dysfunktion [72].

#### 1.1.6.4 Gastrointestinaltrakt

Eine Manifestation des GIT ist eine der häufigsten Komplikationen und betrifft ca. 75 bis 90 % der SSc-Patienten [73]. In 10 % der Fälle sind Gastrointestinale Beschwerden die ersten Symptome einer SSc [74]. Das Auftreten einer GI-Manifestation ist nicht abhängig vom Subtyp der SSc. Jedoch kommt es bei der lcSSc zu einer späteren und milderer Manifestation des GIT als bei der dcSSc [71]. Eine Beteiligung des GIT hat weiterhin eine schlechte Prognose und führt in 6 bis 12 % der Fälle zum Tod [73]. Es kann zu Manifestationen an allen Abschnitten und Organen des GIT kommen, jedoch ist der Ösophagus das am häufigsten betroffene Organ, gefolgt von Anorektum und Dünndarm [75, 76]. Fibrotische Strikturen, Stenosen und ein verminderter Tonus des unteren Ösophagussphinkter führen symptomatisch zu Dysphagie und Reflux [73]. Kommt es zu einer chronischen Refluxerkrankung kann diese zur Entwicklung einer Refluxösophagitis und einer Präkanzerose, dem Barrett-Syndrom, beitragen. Die klinischen Symptome variieren je nach Lokalisation der Manifestation und reichen von GI-Blutungen der Teleangiektasien, Dyspepsie, Malabsorptions-Syndrom und intestinalen Pseudoobstruktionen bis hin zu einer anorektalen Beteiligung, die bei 50 bis 70 % der SSc-Patienten nachzuweisen ist [75]. Der innere Analsphinkter ist in den meisten Fällen betroffen, was sich in Symptomen wie Stuhlinkontinenz, Obstipation oder einem Rektalprolaps zeigt [77]. Aufgrund eines multifaktoriellen Konstrukts aus einer bakteriellen Überwucherung, einer Schädigung der Darmschleimhaut und eines veränderten Stoffwechsels von Nährstoffen leiden SSc-Patienten vermehrt unter einer Malabsorptionsstörung [75, 78]. Deutlich seltener sind SSc-Patienten von einer Lebermanifestation mit klinischen Symptomen einer Leberfunktionsstörung betroffen [73].

#### 1.1.6.5 Haut und Gefäße

Die überschießende Bildung von kollagenreicher extrazellulärer Matrix und die Entstehung von Ödemen führen zu Vaskulopathien und Sklerose der Haut. In über 90 % ist das sekundäre RP das Initialsymptom einer SSc [79]. Grund dafür sind verengte Lumina digitaler Arterien infolge einer Intimaproliferation und Fibrosierung, die 75 % der SSc-Patienten aufweisen [80]. Das RP tritt in schweren

Fällen plötzlich als *Tricolore*-Phänomen auf und ist durch eine plötzlich auftretende Blässe einzelner Finger aufgrund einer verminderten Vaskularisierung der Fingerspitzen gekennzeichnet. Am Ende der Attacke folgt eine reaktive Hyperämie mit Rotfärbung der Finger. In schweren Fällen entwickelt sich eine Ischämie mit Desoxygenierung der Finger, die sich folglich blau färben. Die Attacken können wenige Sekunden bis zu 15 Minuten andauern [71]. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu perivaskulären Ödemen, der Apoptose von Endothelzellen und ischämischen Reperfusionsschäden [79], was zu Fingerspitzenulzerationen führt. Fingerspitzenulzerationen heilen im Verlauf der Erkrankung aus und vernarben. Die Narben der Ulzerationen werden als ‚pits‘ bezeichnet [71].

Fast alle SSc-Patienten, außer denen mit einer *Sclerosis sine scleroderma*, leiden an einer Gewebefibrosierung [56]. Eine vermehrte Hautsklerosierung korreliert mit SSc-assoziierten Organmanifestationen [81]. Ursächlich dafür sind Ödeme und eine übermäßige Ansammlung von kollagenreicher extrazellulärer Matrix [82]. Die dcSSc ist charakterisiert durch eine im frühen Krankheitsstadium auftretende Hautsklerosierung, die zwischen dem 12. und 18. Monat nach Beginn der Hautverdickung den Höhepunkt erreicht und im späteren Verlauf langsamer fortschreitet [56]. Die Klinik der dcSSc und damit der stammbetonten Hautsklerose ist durch eine erschwerte Atmung, Bewegungseinschränkungen und eine Mikrostomie charakterisiert. Teleangiektasien treten zudem als Folge der Vasculopathie im Gesichtsbereich, in Handinnenflächen und im GIT auf. Weitere Symptome sind Calciumablagerungen in der Haut (*Calcinosis cutis*) und eine Hyperpigmentierung der Haut [71].

#### 1.1.6.6 Bewegungsapparat

Die Beteiligung des Bewegungsapparates (BA) ist eine wichtige Komplikation, die häufig übersehen wird [56]. Zusätzlich ist zu beachten, dass ein Teil der SSc-Patienten als Komorbidität häufig an einer rheumatoiden Arthritis mit *Overlap Syndrome* leidet, bei dem es zu Manifestationen des BA kommt. Die Prävalenz der Beteiligung des BA bei SSc-Patienten liegt zwischen 24 und 97 % und ist mit psychosozialen und wirtschaftlichen Belastungen bzw. Behinderungen assoziiert [83]. Klinisch zeigt sich eine BA-Beteiligung in Form einer proximalen

Gelenkschwäche, Gelenkkontrakturen, Steifigkeit, Arthritis und Sehnenreibungen [83]. Leiden SSc-Patienten unter Muskelschwäche und Muskelschmerzen, kann eine Myositis vorliegen, die mit einem erhöhten Risiko einer Herzbeteiligung einhergeht [62].

### **1.1.7 Autoantikörper**

Aak sind ein wichtiger Marker in der Diagnostik einer SSc und bei mehr als 95 % der Patienten nachweisbar [57]. Bisher konnte keine ursächliche Beteiligung der Aak an der Pathogenese der SSc nachgewiesen werden; vielmehr dienen sie als Marker für klinische, genetische und ätiologische Patientenuntergruppen. SSc-spezifische Aak werden als ‚antinukleäre Autoantikörper‘ (ANA) bezeichnet und richten sich überwiegend gegen spezifische Zellbestandteile, darunter Kinetochore-Proteine, ribonukleäre Proteine, Topoisomerase- und RNA-Polymerase-Enzyme [57]. Studien haben gezeigt, dass bei 81,6 % der SSc-Patienten SSc-spezifische Aak nachweisbar sind [16]. Mittlerweile ist eine Vielzahl von SSc-spezifischen nukleären Aak bekannt, die der Einteilung und Diagnostik dienen. Ferner sind einzelne Aak mit charakteristischen Organmanifestationen sowie charakteristischen demographischen und genetischen Manifestationen positiv oder negativ assoziiert und können somit diagnostische Hinweise auf Organmanifestationen geben (siehe Tabelle 5)

Studien haben gezeigt, dass unter den SSc-Patienten, bei denen ACAs nachweisbar sind, bis zu 88,7 % an einer lcSSc leiden. Umgekehrt wurden diese ACAs nur bei 46,7 % der lcSSc-Patienten identifiziert [84]. Die Prävalenz von ACAs ist bei Frauen höher als bei Männern. Dazu sind ACAs mit digitaler Gangrän und PAH assoziiert und ein positiver Prädiktor für Muskel- und Gelenkmanifestationen [57].

Scl-70 (synonym zu Topoisomerase I) ist ein 70 kDa großes Protein, das mit Chromatin assoziiert ist [85]. Bei der dcSSc sind bei 15 bis 40 % der Patienten ATA (auch Anti-Scl-70-Autoantikörper) nachweisbar [16, 57, 86, 87]. ATA-positive Patienten haben eine schlechtere Prognose aufgrund eines erhöhten Risikos, an einer pulmonalen Fibrose und damit assoziiertem Rechtsherzversagen zu erkranken [85, 88-90]. Ferner ist das Auftreten von ATA bei der SSc mit einer

Beteiligung des Mundes und der Entwicklung digitaler Ulzerationen verbunden [16].

Deutlich seltener sind Anti-RNA-Polymerase-III(POL3)-Aak bei der SSc nachweisbar. Interessanterweise finden sich epidemiologische Unterschiede im Auftreten von Anti-POL3-Aak. So konnten in Europa bei 4 bis 31,5 %, in Amerika bei 10 bis 25 % und in Japan bei 5 bis 11 % der SSc-Patienten Anti-POL3-Aak serologisch nachgewiesen werden [16]. Studien haben gezeigt, dass Anti-POL3-Aak häufiger mit der dcSSc (14,5 %) als mit der lcSSc (6 %) assoziiert sind [91]. Der Nachweis von Anti-Pol3-Ak ist mit einer Beteiligung von Haut, Gelenken und Nieren verknüpft [16, 57, 91]. Eine Nierenkrise unter Nachweis von Anti-POL3-Aak wurde bei 14 % der SSc-Patienten diagnostiziert [91]. Prognostisch günstig sind Anti-POL3-Aak in Bezug auf eine pulmonale Fibrosierung und muskuloskelettale Manifestationen [57].

Aak gegen Fibrillarin (U3-RNP) sind je nach Studie bei 1,4 bis 8 % der SSc-Patienten nachweisbar. Anti-U3-RNP-Aak sind vermehrt mit der dcSSc assoziiert, liegen aber auch bei der lcSSc vor [16, 92, 93]. Anti-U3-RNP-Aak haben eine erhöhte Prävalenz bei männlichen, afroamerikanischen und hispanischen SSc-Patienten [94, 95]. Verglichen mit Anti-U3-RNP-Aak-negativen SSc-Patienten erkranken Anti-U3-RNP-Aak-positive Patienten im Schnitt früher, erzielen signifikant höhere Werte im Rodnan-Skin-Score (Hau), haben eine erhöhte Prävalenz an muskuloskelettalen Beteiligungen [16, 94] und weisen ein erhöhtes Risiko auf, an einer PAH zu erkranken [94]. Das Auftreten von GI-Beschwerden wie Malabsorptionsstörungen und Pseudo-Obstruktionen sowie die Notwendigkeit einer Hyperalimentation waren signifikant häufiger bei Patienten mit Anti-U3-RNP-Aak [16].

U1-ribonukleäre Proteine (U1-RNP) sind wichtige Zellbestandteile und dienen dem Spleißen der Vorläufer-Boten-DNA [96]. Anti-U1-RNP-Aak haben eine Frequenz von 11 % in dcSSc-Patienten und 10 % in lcSSc-Patienten [57], sind nicht SSc-spezifisch und somit auch bei weiteren Kollagenosen wie dem SLE und der Polymyositis nachweisbar [97]. Eine erhöhte Prävalenz von Anti-U1-RNP-Aak ist bei afroamerikanischen SSc-Patienten zu beobachten. Anti-U1-RNP-Aak-

positive SSc-Patienten erkranken im Schnitt früher, haben die höchste Prävalenz einer Gelenkmanifestation und weisen eine verbesserte Überlebensrate auf, verglichen mit Anti-U1-RNP-Aak-negativen SSc-Patienten [57].

Anti-Pm/Scl-Aak richten sich gegen einen Multiproteinkomplex in den Nukleoli. Die Funktion dieses Multiproteinkomplexes ist bis heute nicht ausreichend geklärt [98]. Anti-Pm/Scl-Aak haben eine Frequenz von 2 % bei dcSSc-Patienten und 7 % bei lcSSc-Patienten [57]. Typischer ist der Nachweis von Anti-Pm/Scl-Aak beim *Overlap Syndrome* (Sklerodermie/Dermatomyositis), wo sie bei ca. 24 % der Patienten identifizierbar sind [16, 98]. Anti-Pm/Scl-Aak-positive SSc-Patienten weisen verglichen mit Anti-Pm/Scl-Aak-negativen Patienten vermehrt eine Muskelentzündung und seltener Manifestationen der inneren Organe auf [16]. Außerdem ist der Nachweis von Anti-Pm/Scl-Aak mit einer verbesserten Krankheitsprognose trotz einer hohen Inzidenz einer ILD assoziiert [99].

Anti-th/to-Aak sind weitere Aak die vermehrt bei der SSc nachgewiesen werden. Autoantigene sind hier die mit Th/7-s- und To/8-2-RNAs-assoziierten Proteine. Die Prävalenz von Anti-th/to-Aak ist bei lcSSc-Patienten mit 24 % deutlich höher als bei dcSSc-Patienten mit 2 % [57]. Der Nachweis von Anti-th/to-Aak geht mit einer erhöhten Prävalenz von ILD, PAH und Myositis einher [100]. Studien haben gezeigt, dass Anti-th/to-Aak-seropositive SSc-Patienten die schlechteste Prognose aufweisen [57].

**Tabelle 5: Anteil der SSc-spezifischen Autoantikörper bei Organbeteiligung der SSc [7]**

	<b>CenpB</b>	<b>ATA</b>	<b>POL3</b>	<b>Th/To</b>	<b>U3-RNP</b>
diffuses kutanes Muster	5	71	85	7	64
Arthritis	60	86	88	60	89
digitale Ulzera	61	63	42	29	58
Myositis	1	9	4	6	18
fibrosierende Alveolitis	6	23	7	16	24
PAH	19	2	6	32	24

Die Anteile sind in Prozent angegeben.



### **1.1.8 Funktionelle Autoantikörper**

Es wurden bereits diverse antinukleäre Aak zur Diagnose, Klassifizierung und Prognose identifiziert. Die pathogenetische Funktion dieser Aak ist jedoch weitestgehend unbekannt [101]. Funktionelle Aak tragen bei unterschiedlichen AIDs wie der Myasthenia gravis zum Pathomechanismus der Erkrankung bei. Definitionsgemäß bindet ein funktioneller Antikörper nicht nur sein Target-Antigen – meist Rezeptoren oder Enzyme –, sondern wirkt auch stimulierend oder inhibierend [102]. Im Zusammenhang mit der SSc konnten bereits mehrere funktionelle Antikörper gegen membranöse Rezeptoren und deren Pathomechanismus identifiziert werden [103].

In den folgenden Absätzen werden funktionelle Aak, für die eine pathogenetische Rolle in der Entstehung der SSc nachgewiesen wurde, genauer erläutert. In einer Studie konnten Aak gegen den *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) nur bei SSc-Patienten nachgewiesen werden, jedoch nicht bei gesunden Probanden. Der PDGFR gehört zu den Tyrosinkinase-Rezeptoren, die auf der Plasmamembran von Fibroblasten exprimiert werden [104]. In einer weiteren Studie konnte festgestellt werden, dass stimulierende Aak gegen den PDGFR den Ha-RasERK1/2-Ros-Signalweg induzieren können. Dadurch kommt es zur verstärkten Kollagen-Typ-I-Genexpression in Fibroblasten [104, 105]. Zudem induzierten Aak gegen den PDGFR eine Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten [105].

Aktuelle Daten deuten darauf hin, dass Aak gegen den muskarinischen Acetylcholinrezeptor M3 (mAChR3) eine verminderte Acetylcholin-Wirkung an der glatten Muskulatur, insbesondere im GIT, zur Folge haben. Somit tragen diese Aak zum pathogenen Mechanismus einer GIT-Beteiligung bei SSc-Patienten bei [106]. Bei 64 % der SSc-Patienten, die unter gastrointestinaler Pseudoobstruktion und/oder Malabsorptionsstörungen litten, konnten Aak gegen den mAChR3 nachgewiesen werden. Dies war nur bei 5 % der Patienten ohne die oben genannten Beschwerden der Fall [106]. Studien zeigen, dass der Transfer gereinigter Immunglobuline (Ig) aus Patienten mit SSc, die hohe Titer von antineuronalen Antikörpern aufweisen, die myenterische elektrische Aktivität im Ratten-Darm

hemmt. Die Applikation von Ig gesunder Probanden hatte dagegen keine inhibierende Wirkung [107]. Ferner konnte festgestellt werden, dass IgG von SSc-Patienten die Wirkung des mAChR3-Agonisten Carbachol spezifisch hemmen, während andere myenterische Rezeptoren nicht inhibiert werden [108]. Aufgrund der Studienlage lässt sich annehmen, dass inhibitorische Aak gegen den mAChR3 eine entscheidende Rolle im Pathomechanismus, insbesondere im GIT von Patienten mit SSc, spielen [103].

Anti-Endothelzell-Antikörper (AEZAK) konnten nicht nur bei SSc, sondern auch bei weiteren rheumatischen Erkrankungen nachgewiesen werden. AEZAK haben abhängig von der Methodik eine Prävalenz von 25 bis 49,5 % bei SSc-Patienten [109, 110]. AEZAK von SSc-Patienten induzieren durch eine Hochregulation der Adhäsionsmoleküle *vascular adhesion molecule 1* (VCAM-1), *intracellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) und E-Selektin eine Endothelzellaktivierung [111]. In mikrovaskulären Hautzellen bewirkten AEZAK von SSc-Patienten eine Apoptose mittels der Induktion des Caspase-3-Weges [112] und der Expression von Fibrillin-1 [113]. Die Studienlage deutet darauf hin, dass AEZAK mit einer proinflammatorischen Aktivierung von Endothelzellen zum Fortschreiten der Krankheit beitragen [114].

Der Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptor (AT<sub>1</sub>R) und der Endothelin-Typ-A-Rezeptor (ET<sub>A</sub>R) werden auf der Zellmembran von Endothelzellen und auf Zellen des Immunsystems exprimiert (siehe Kap. 1.2), sodass eine Aktivierung eine Vielzahl zellulärer und systemischer Ereignisse auslöst. Anti-AT<sub>1</sub>R-Aak und Anti-ET<sub>A</sub>R-Aak von SSc-Patienten induzieren in humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-1) einen Anstieg des mRNA-Spiegels von VCAM1 und dem proinflammatorischen Chemokin-Interleukin-8 (IL-8) [115]. VCAM-1 fördert die Adhäsion und Infiltration von Leukozyten in die Haut der Patienten [115, 116]. Die proinflammatorische Aktivierung von HMEC-1 durch Anti-AT<sub>1</sub>R-Aak erhöht die Migration neutrophiler Granulozyten durch Endothelzellen und die damit verbundene Aktivierung von *reactive oxygen species* (ROS) [115]. In einer weiteren Studie konnte festgestellt werden, dass mit Anti-AT<sub>1</sub>R-Aak stimulierte HMEC-1 vermehrt TGF-beta produzieren [117]. TGF-beta ist ein Zytokin, das Fibroblasten aktiviert und

deren Proliferation steigert. Dies könnte zu einer vermehrten Synthese von Kollagen und extrazellulärer Matrix führen [118]. Zusätzlich haben Anti-AT<sub>1</sub>R-Aak einen negativen Einfluss auf die Endothelreparaturfunktion [115]. In peripheren mononukleären Blutzellen stimulieren Anti-AT<sub>1</sub>R-Aak und Anti-ET<sub>A</sub>R-Aak die Sekretion von Chemokin-Ligand 8, IL-8 und zusätzlich die T-Zell-Chemotaxis [119]. Die erhöhten Plasmaspiegel von IL-8, die bei SSc-Patienten vermehrt nachweisbar sind, aktivieren Phagozyten, neutrophile Granulozyten, Fibroblasten und Endothelzellen und können ursächlich für eine inflammatorisch bedingte Gewebeschädigung sein [120, 121]. Der Nachweis von erhöhten Angiotensin-II(ATII)- und Endothelin-1(ET-1)-Blutspiegeln bei SSc-Patienten führt angesichts ihrer vasokonstriktorisches, proinflammatorischen, proliferativen und profibrotischen Funktionen zu der Hypothese, dass der AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R in die Pathogenese der SSc involviert sind [117, 122, 123]. Aak von SSc-Patienten, die gegen den AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R gerichtet sind, erhöhen die Sensibilität des jeweiligen Rezeptors für ATII und ET-1 [124]. Dies könnte das Auftreten einer vermehrten Vasokonstriktion von Gefäßen bei der SSc erklären. Patienten mit SSc zeigen intrinsische Defekte des Renin-Angiotensin- und Endothelin-Systems, wie eine erhöhte Prävalenz des Vasokonstriktors ATII gegenüber dem Vasodilatator Angiotensin 1-7 zeigt [125]. Erhöhte Titer von Aak gegen den AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R sind bei ca. 85 % der SSc-Patienten nachweisbar [117, 124] und korrelieren mit PAH, ILD, digitalen Ulcera und SSc-assoziiierter Mortalität [117, 124, 126].

Therapeutische Ansätze wurden mittels ET<sub>A</sub>R-Antagonisten gefunden: So reduzieren ET<sub>A</sub>R-Antagonisten das Auftreten von PAH, einer der Haupttodesursachen im Zusammenhang mit SSc [127]. Es konnte zudem festgestellt werden, dass der Transfer von AT<sub>1</sub>R -Aak in Mäuse eine Zellvermehrung von neutrophilen Granulozyten in der bronchoalveolären Lavage und zusätzlich strukturelle Veränderungen in der Lunge hervorruft [115]. Durch die Zugabe von AT<sub>1</sub>R- und ET<sub>A</sub>R-Antagonisten konnten die durch Anti-AT<sub>1</sub>R-Aak und Anti-ET<sub>A</sub>R-Aak induzierten Effekte reduziert werden [115, 125]. Anti-ET<sub>A</sub>R-Aak- und Anti-AT<sub>1</sub>R-Aak-Titer von SSc-Patienten korrelieren miteinander und weisen eine Kreuzreaktivität mit dem jeweils anderen Rezeptor auf [117]. Nicht nur bei der SSc, auch bei weiteren rheumatischen Erkrankungen sind erhöhte Titer von Anti-AT<sub>1</sub>R-Aak und

Anti-ET<sub>A</sub>R-Aak nachweisbar und mögliche Pathomechanismen identifiziert worden [128, 129].

### **1.1.9 Diagnostik**

Die Diagnosestellung einer SSc ist aufgrund des oligosymptomatischen Krankheitsbeginns und der Vielzahl der betroffenen Organe anspruchsvoll [71]. Da die SSc ein heterogenes Krankheitsbild aufweist, benötigen die Erkrankten eine interdisziplinäre Betreuung. Der Basisdiagnostik dienen weiterhin die Anamnese und das Erkennen von Symptomkomplexen. Bei Verdacht auf eine SSc wird die Diagnose mithilfe serologischer Untersuchungen gestützt. Eine weitere Differenzierung der ANAs wird aufgrund der Assoziation von Autoantikörperprofilen mit Organmanifestationen (siehe Kap. 1.1.7) empfohlen [16]. Zur weiteren Diagnostik der mit SSc verknüpften Pathologien dienen diagnostische Untersuchungen der Rheumatologie, Dermatologie, Gastroenterologie, Pulmologie, Nephrologie und Kardiologie. Dies ermöglicht es, Organmanifestationen frühzeitig zu erkennen und zu therapieren [71]. Bei einem Großteil der SSc-Patienten verläuft die Erkrankung langsam progredient. Bei der dcSSc schreitet die Erkrankung jedoch rasch voran und es kommt zu einer starken Zunahme der stammbetonten Hautsklerosierung und zu früh auftretenden Organmanifestationen. Zusätzlich korrelieren Organmanifestationen wie die PAH und eine rasch progrediente Hautfibrosierung mit einer erhöhten Mortalität, was die Wichtigkeit einer frühzeitigen Diagnosestellung unterstreicht [130, 131]. Ziel sollte es sein, Patienten mit einem rasch progredienten Verlauf schnellstmöglich zu identifizieren und einem rheumatologischen Zentrum vorzustellen [71].

#### **1.1.9.1 Initialdiagnostik von Haut, Gefäßen und Bewegungsapparat**

Bei der klinischen Untersuchung von Haut und Gefäßen wird der Fokus auf SSc-spezifische Symptome wie eine zunehmende Hautfibrosierung oder vaskuläre Veränderungen, die in Form eines RP symptomatisch werden oder mikroskopisch erkennbar sind, gelegt. Zur Beschreibung der Aktivität und des Verlaufs der Hautfibrose dient der modifizierte Rodnan-Skin-Score (mRSS) [71]. Dazu werden 17 definierte Hautareale durch klinische Palpationen beurteilt. Zur Untersuchung der Hautdicke wird die Haut des Patienten zwischen Zeigefinger und Daumen

eingeklemmt und es wird eine Hautfalte gebildet [132]. Anschließend werden Punkte zwischen 0 und 3 vergeben, wobei ein Score von 0 einer normalen, gesunden Haut entspricht. Ein Score von 1 kennzeichnet eine milde Hautverdickung. In diesem Fall hat der Untersucher keine Schwierigkeiten, eine Hautfalte zu bilden. Ein Score von 2 definiert eine moderate Hautverdickung, bei der der Untersucher Schwierigkeiten hat, eine Hautfalte zu bilden. Ist es dem Untersucher nicht möglich, eine Hautfalte zu bilden, wird ein Score von 3 vergeben, der auf eine schwerwiegende Hautfibrosierung hinweist [71, 132].

Vaskuläre Veränderungen können frühzeitig mittels Kapillarmikroskopie erkannt werden. Wegweisend für SSc-assoziierte vaskuläre Veränderungen sind Megakapillaren zusammen mit vaskulären Arealen [133]. Bei klinischem Verdacht auf eine Kalzinose sollte eine Röntgenaufnahme des entsprechenden Hautareals erstellt werden [71]. Analog zur Haut- und Gefäßbeteiligung liegt bei der Untersuchung des Bewegungsapparates das Hauptaugenmerk auf der klinischen Diagnostik. Dabei sollte der Bewegungsapparat auf funktionelle Bewegungseinschränkungen, Kontrakturen, Synovitis, Sehnenreiben und Muskelschwäche untersucht werden. Eine Magnetresonanztomographie kann zum Ausschluss einer Myositis dienen. Zudem kann die Bestimmung der Blutsenkungsgeschwindigkeit und Kreatinkinase zur frühzeitigen Diagnostik einer Myositis hilfreich sein [71].

#### 1.1.9.2 Initialdiagnostik innerer Organe

Die im Folgenden beschriebenen Maßnahmen zur Initialdiagnostik von Organmanifestationen werden vom DNSS empfohlen. Die Diagnostik von SSc-assoziierten Manifestationen der inneren Organe ist ein Zusammenspiel aus klinischen, anamnestischen und apparativen Untersuchungen.

Die Diagnostik der gastrointestinalen Beteiligungen des oberen GIT konzentriert sich auf Verfahren der Ösophagusgastroskopie, Ösophagogastromanometrie und 24-Stunden-pH-Metrie. Die Ösophagusmanometrie kann Hinweise auf eine Schluckstörung oder eine eingeschränkte Funktion des unteren Ösophagussphinkters geben. Zur Diagnostik eines nächtlichen oder asymptomatischen Refluxes dient die 24-Stunden-pH-Metrie. Die Ösophagusgastroskopie ermöglicht Erkenntnisse über strukturelle Veränderungen und das Vorliegen eines

Barett-Syndroms aufgrund einer eingeschränkten Funktion des unteren Ösophagussphinkters. Ein Atemtest zur Diagnosestellung von Unverträglichkeiten, unter denen viele Patienten leiden, kann bei unspezifischen gastrointestinalen Symptomen von Nutzen sein [134]. Eine rektale Inkontinenz wird mittels anorektaler Manometrie und Elektromyographie diagnostiziert [71].

Die Lunge ist bei 80 % der Patienten mit SSc betroffen. Daher sollten klinische, serologische, radiologische und funktionelle Untersuchungen durchgeführt werden. Durch die Serologie können Antikörperprofile identifiziert werden, die mit Lungenmanifestationen assoziiert sind. Diese wurden bereits in Kapitel 1.1.7 beschrieben. Zur frühzeitigen Diagnostik einer ILD dienen Röntgenuntersuchungen und eine hochauflösende Computertomographie (h-CT) des Thorax. Eine Röntgenuntersuchung ist zur Ersterfassung von Patienten indiziert, die eine unauffällige Lungenfunktion aufweisen. Eine h-CT wird bei Patienten empfohlen, bei denen dcSSc oder eine pathologische Lungenfunktion vorliegt [71]. Das Röntgen und die h-CT liefern Informationen über strukturelle Veränderungen, geben jedoch keine Informationen über funktionelle Aspekte. Die Bodyplethysmographie zusammen mit der Bestimmung der Diffusionskapazität vermittelt Informationen über die Funktionalität der Lunge. Die Diffusionskapazität ist ein sensitiver Parameter, der genutzt wird, um eine klinisch unauffällige Lungenbeteiligung zu diagnostizieren. Eine eingeschränkte Diffusionskapazität weist in Zusammenhang mit einer normalen forcierten Lungenkapazität auf ein erhöhtes PAH-Risiko hin [71]. Zusätzlich können ein EKG, röntgenologische Untersuchungen des Thorax und klinische Symptome Hinweise auf eine PAH geben. Bei einem konkreten Verdacht kann eine Echokardiographie mit Messung des systolischen pulmonal-arteriellen Drucks weitere Hinweise auf eine PAH liefern [59, 135]. Zur Diagnose-sicherung ist jedoch eine Rechtsherzkatheteruntersuchung erforderlich. Im Verlauf können Laboruntersuchungen auf BNP/NTproBNP zu Hinweisen auf eine Rechtsherzbelastung infolge einer PAH führen [59].

Zur Überprüfung der Nierenfunktion sollte initial der Urin auf Sedimente, Gesamteiweiß und Albumin untersucht werden. Eine Serumkreatininbestimmung kann Hinweise auf eine verminderte glomeruläre Filtrationsrate geben. Anhand

einer Nierenultraschalluntersuchung inklusive der Nierengefäße und einer Blutdruckmessung ergeben sich strukturelle und funktionelle Informationen über die Niere [71].

Eine primäre oder sekundäre Herzbeteiligung sollte initial bei jeder diagnostizierten SSc untersucht werden. Apparativ dienen EKG, Echokardiographie, Spiroergometrie und eine Blutdruckmessung über 24 Stunden der Diagnostik. Eine detailreiche klinische Untersuchung nach typischen Symptomen wie Angina pectoris, Palpitationen oder Dyspnoe sollte der apparativen Diagnostik zuvorkommen [71].

#### 1.1.9.3 Jährliche Verlaufsdagnostik

Neben der klinischen Diagnostik sollten bei allen SSc-Patienten die im Folgenden dargestellten Untersuchungen jährlich durchgeführt werden. Der Fokus der Verlaufskontrollen liegt auf den mit SSc assoziierten Organmanifestationen. Eine Bodyplethysmographie zur Lungenfunktionsprüfung unter Bestimmung der totalen Lungkapazität, forcierten Lungkapazität und der Diffusionskapazität ist im jährlichen Verlauf oder bei Progredienz in drei- bis sechsmonatigen Intervallen empfohlen. Eine PAH induziert eine verminderte linksventrikuläre Ejektionsfraktion, die im Verlauf zu einem Rechtsherzversagen führt. Dies unterstreicht die Wichtigkeit einer transthorakalen Echokardiographie zur Überprüfung eines erhöhten pulmonal-arteriellen Drucks. Ebenfalls wird eine jährliche Spiroergometrie zur Überprüfung der kardiopulmonalen Limitation empfohlen. Eine halbjährliche laborchemische Überprüfung der Eiweißausscheidung dient dem Ausschluss einer Beteiligung der Nieren. Zusätzlich ist jährlich eine Kapillarmikroskopie durchzuführen. Die beschriebenen Maßnahmen werden vom DNSS empfohlen und dienen der jährlichen Verlaufsdagnostik sowie dem frühzeitigen Erkennen beginnender Organmanifestationen [71].

#### **1.1.10 Therapie**

Die EULAR empfiehlt zur Behandlung einer SSc eine auf den Patienten optimierte evidenzbasierte medizinische Behandlung. Zurzeit besteht noch keine standardisierte Behandlungsstrategie für die Therapie einer SSc [136]. Es konnte gezeigt werden, dass ein frühes Vorstellen von SSc-Patienten in interdisziplinären Zentren und eine konservative Therapie (Lymphdrainage, Ergotherapie)

wichtige Bestandteile einer erfolgreichen Therapie sind [134]. Dazu wird eine symptomorientierte und immunmodulierende Therapie angestrebt. Eine Verbesserung der klinischen, physiologischen und radiologischen Entwicklung der SSc-bezogenen ILD kann durch eine Therapie mit intravenöser Gabe von Cyclophosphamid und hochdosiertem Prednisolon erzielt werden [137]. Die Therapie mit Glukokortikoiden sollte jedoch aufgrund des hohen Nebenwirkungsprofils nur eng gestellt und gut überwacht werden [136]. Eine Therapie mit Methotrexat führte in Studien zur Verbesserung der Hautbeteiligung, insbesondere im frühen Verlauf der dcSSc. Die Behandlung mit Methotrexat kann bei der dcSSc unter Ausschluss von Kontraindikationen in Betracht gezogen werden [138-140]. Das Vermeiden von Kälte und eine absolute Nikotinkarenz sind allgemeine Maßnahmen zur Behandlung digitaler Vaskulopathien wie dem RP und digitalen Ulzerationen.

Laut Studien treten SSc-assoziierte RP durch den Einsatz von Nifedipin und Phosphodiesterase-5-Inhibitoren (PDE5I) seltener auf [141-143]. Die EULAR empfiehlt deshalb Nifedipin als Erstlinientherapie bei SSc-assoziierten RP [136]. Nach misslungener Therapie mit Nifedipin und PDE5I oder schweren Fällen ist Iloprost das Mittel der Wahl [136], das in Studien zu einer Verbesserung und Verringerung von SSc-assoziierten RP führte [144]. Iloprost und PDE5I ermöglichen eine Verbesserung digitaler Ulzerationen und werden daher von der EULAR empfohlen. Zur Prophylaxe digitaler Ulzera, insbesondere bei bereits vorhandenen Ulzerationen, ist eine ergänzende Therapie, neben der Therapie mit Calcium-Kanal-Antagonisten, PDE5I und Iloprost, mit Bosentan induziert [136]. In Studien konnte das Auftreten neuer digitaler Ulzerationen mithilfe von Bosentan reduziert werden [145].

Zur Therapie einer SSc-assoziierten PAH werden ET<sub>A</sub>R-Antagonisten, PDE5I, Riociguat, Epoprostenol und Prostacycline empfohlen. Die Indikation für Epoprostenol sollte erst in einem späteren Stadium gestellt werden [136, 146, 147]. In Studien konnten durch eine Kombinationstherapie mit den aufgeführten Substanzen das Überleben und die Leistungsfähigkeit von SSc-Patienten, die unter einer PAH litten, verbessert werden [134].



Protonenpumpeninhibitoren werden zur Therapie einer Refluxösophagitis und zur Prävention von Ösophagusulzerationen angewendet [148, 149]. Bei Vorhandensein einer GI-Dysmotilität sollte eine individuelle Therapie mit einem Prokinetikum angestrebt werden [136].

Bei einer sich entwickelnden SSc-assoziierten renalen Krise wird eine sofortige hochdosierte Therapie mit ACE-Hemmern empfohlen. Die Therapie sollte langfristig durchgeführt werden, solange die Möglichkeit einer Verbesserung der Nierenfunktion besteht [66, 136].

Neben den beschriebenen medikamentösen und invasiven Maßnahmen können allgemeine Maßnahmen wie Bewegungs- und Psychotherapien ein wichtiger Bestandteil zur Bewältigung von Krankheitssymptomen sein.

### **Autologe hämatopoetische Stammzelltransplantation bei SSc-Patienten**

Die Behandlung hämatologischer Malignome mit parallel bestehender AID mit Hochdosis-Chemotherapien und anschließender autologer hämatopoetischer Stammzelltransplantation (aHSZT) zeigt positive Effekte und bewirkt teilweise sogar die Remission der AID [150, 151]. Daher eignet sich dieses Behandlungsschema auch primär zur AID-Therapie [152]. Seit 1996 wurden aHSZT im Rahmen mehrerer Studien zur Therapie therapierefraktärer und schwerer Fälle durchgeführt [153]. Die aHSZT ist zurzeit das wirksamste therapeutische Mittel zur Therapie der SSc [134] und sollte bei Patienten mit einer schlechten Prognose vor Auftreten von Organmanifestationen durchgeführt werden [154]. In Studien konnte eine Verbesserung der Pulmonal- und Hautmanifestationen erzielt werden [155]. Das primäre Ziel einer autologen Stammzelltransplantation ist es, den Progress und die Krankheitsaktivität zu stoppen [156]. Ursächlich für den Erfolg einer aHSZT scheint ein Neustart des Immunsystems mit einer Eradikation autoreaktiver Lymphozyten zu sein. Die Reinfusion körpereigener Stammzellen soll die Bildung eines neuen antigennaiven Immunsystems aus eigenen hämatopoetischen Stammzellen des Patienten induzieren. Erforderlich für die Rekonstruktion des Immunsystems ist die adäquate Ausreifung einer neuen Generation nicht autoreaktiver (antigennaiver) T-Zellen [157]. Eine aHSZT wird in drei

komplexen therapeutischen Schritten durchgeführt, deren Ausführung in Kliniken und Studien variiert:

1. Mobilisierung der Stammzellen mittels Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktors und Cyclophosphamid
2. Leukapherese und Selektion der CD34+-Stammzellen
3. Konditionierung mit Cyclophosphamid, Antithymozyten-Globulin oder Ganzkörperbestrahlung mit anschließender Transplantation von CD34+-Stammzellen

Ziel der aHSZT ist es, Immunreaktionen, die zum pathologischen Prozess beitragen, zu reduzieren oder zu eliminieren. Verglichen mit den Konditionierungsschemata für hämatologische Malignome besteht bei der SSc keine Notwendigkeit, die Stammzellpopulation im Knochenmark zu eliminieren. Die Zerstörung hämatopoetischer Stammzellen wäre eine unerwünschte Nebenwirkung [157]. Eine Immunablation ohne myeloablative Nebenwirkungen wird durch lymphozyten-spezifische Substanzen erreicht und zur Therapie der SSc verwendet [157]. Diese Substanzen führen wahrscheinlich zu einer erhöhten Rezidivrate, jedoch sind die Knochenmarkstoxizität sowie die therapieassoziierte Morbidität und Mortalität vermindert [158]. So konnte eine Studie zeigen, dass fünf Jahre nach der aHSZT das progressionsfreie Überleben von SSc Patienten 55 % betrug. Die transplantatabhängigen Mortalität lag bei 6,9 % [159]. Neben der Durchführung einer aHSZT in ausgewählten Zentren dient eine durch Experten vorgenommene ausführliche Bewertung des Nutzen-Risiko-Verhältnisses einer solchen aHSZT der Reduktion behandlungsabhängiger Nebenwirkungen und behandlungsabhängiger Mortalität [136].

#### **1.1.11 Risikofaktoren und Mortalität**

Die Mehrzahl der Patienten, die an einer SSc erkranken, stirbt an dieser oder den mit der Krankheit assoziierten Folgen [134]. Elhai et al. analysierten Daten der *European Sklerodermie Trials and Research Group*, die Daten von 11 193 SSc-Patienten in ihrem Register führt. Die Analyse ergab, dass innerhalb von zwei bis drei Jahren 9,6 % der Patienten starben, 58 % davon an den direkten Folgen der SSc [134, 160]. Die häufigsten Todesursachen sind die pulmonale Fibrose, die

PAH, Malignome und kardiale Pathologien [54, 160, 161]. Eine weitere Studie aus Frankreich zeigte, dass SSc-Patienten fünfmal häufiger an einer Infektion sterben als die gesunde Bevölkerung [160].

Die Prognose wird durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst. Riemekasten et al. beschreiben folgende Faktoren, die das Risiko erhöhen, an den Folgen einer SSc zu sterben [134]:

- Alter
- männliches Geschlecht
- diffuse kutane SSc
- erhöhtes CRP
- NYAH < II
- interstitielle Lungenerkrankung
- niedrige Diffusionskapazität
- Proteinurie
- renale Krise
- reduzierte linksventrikuläre Ejektionsfraktion
- digitale Ulzera
- Gelenkbeteiligung

Patienten mit einem Nachweis von Anti-th/to-Aak bei der lcSSc und Anti-U3-RNP-Aak bei der dcSSc haben die schlechtesten Überlebensraten verglichen mit Patienten mit SSc-assoziierten Aak [57]. Funktionelle Antikörper wie Anti-AT<sub>1</sub>R-Aak oder Anti-ET<sub>A</sub>R-Aak sind mit schweren Organmanifestationen assoziiert und somit negative Prädiktoren [162].

## **1.2 Angiotensin II und Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptor**

ATII ist der Agonist des AT<sub>1</sub>R und der Haupteffektor des Renin-Angiotensin-Systems und übt somit eine Vielzahl an Funktionen aus. Es vermittelt die meisten Effekte über den AT<sub>1</sub>R und weist verschiedene physiologische Wirkungen auf. So trägt es zu kardiovaskulären, renalen und endokrinen Funktionen bei und spielt nicht nur bei physiologischen Mechanismen eine Rolle, sondern auch eine pathologische Rolle in der Pathogenese der Hypertonie. Ferner hat ATII eine

Bedeutung als Wachstumsfaktor an Fibroblasten, Nebennierenrinden-, vaskulären Glattmuskel- und Herzmuskelzellen [163]. Auch ein Effekt auf die Angiogenese durch ATII konnte beobachtet werden [164].

Der AT<sub>1</sub>R gehört zur Familie der Guanosintriphosphat-bindenden-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPKR) (siehe Kap. 1.3). Er besteht aus 359 Aminosäuren [165] und wird in unterschiedlichen Organen wie Nebennieren, Gehirn, Leber, Herz [163] und in peripheren mononukleären Blutzellen exprimiert, in denen er unterschiedliche Funktionen übernimmt. Nach Bindung von ATII ändert sich die Konformation des AT<sub>1</sub>R und wird aktiviert (siehe Kap. 1.3). Ein erhöhter intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Spiegel aktiviert die Zelle und verursacht abhängig vom Zelltyp unterschiedliche Mechanismen wie eine Kontraktion von Muskelzellen, eine renale Salz- und Wasserretention, eine Aldosteron- und Vasopressinfreisetzung oder auch eine Stimulation des Zellwachstums. Die aktivierte Proteinkinase C induziert zusammen mit Ca<sup>2+</sup> die vermehrte Expression von wachstumsbedingten Transkriptionsfaktoren [163, 166]. Eine dauerhafte Stimulierung der Rezeptoren verursacht eine verminderte Expression. Dies konnte in peripheren mononukleären Blutzellen von SSc-Patienten nachgewiesen werden [119].

### **1.3 Guanosintriphosphat-bindende-Protein-gekoppelte Rezeptoren**

Im Menschen wurden 420 unterschiedliche Guanosintriphosphat-bindende-Protein(G-Protein)-gekoppelte Rezeptoren (ausgeschlossen olfaktorische GPKR) identifiziert. Diese bilden die größte Gruppe der membranständigen Rezeptoren. Dazu wurden 16 781 Liganden ermittelt, die mit GPKR interagieren [167]. Die GPKR sind intramembranöse Rezeptoren, die durch sieben hydrophobe transmembranöse  $\alpha$ -Helices sowie ein extrazelluläres N-terminales und ein intrazelluläres C-terminales Ende charakterisiert sind. Die  $\alpha$ -Helices werden durch jeweils drei intrazellulär und drei extrazellulär liegende Schleifen miteinander verbunden. Namensgebend für den Rezeptor ist das membranständige intrazellulär bindende G-Protein. G-Proteine sind heterotrimere Proteine, die sich aus einer  $\alpha$ -, einer  $\beta$ - und einer  $\gamma$ -Untereinheit zusammensetzen. Durch Bindung eines Agonisten oder aktivierenden Liganden kommt es zur Stabilisierung der Konformation des GPKR. Aufgrund der Konformationsänderung interagiert der GPKR mit

seinem gebundenen G-Protein, das an seiner  $\alpha$ -Untereinheit GDP gegen GTP austauscht. Als Folge dessen kommt es zur Dissoziation der  $\beta$ - und der  $\gamma$ -Untereinheit von der  $\alpha$ -Untereinheit. Die  $\alpha$ -Untereinheit (s) stimuliert die Adenylatcyclase, was eine intrazelluläre Konzentrationssteigerung des cyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP) bewirkt. Der Gegenspieler ist die  $\alpha$ -Untereinheit (i), die die Adenylatcyclase hemmt und die Konzentration von cAMP senkt.

Ein anderer Signalweg des GPKR läuft über die G-Protein- $\alpha$ -q-Untereinheit, die eine Aktivitätssteigerung der Proteinkinase C induziert. Die Phospholipase C wiederum spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in Diacylglycerin und Inositol-1,4,5-trisphosphat. Diacylglycerin bleibt membranständig und aktiviert die Proteinkinase C, was zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg durch membranständige Rezeptoren führt. Inositol-1,4,5-trisphosphat bindet an Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums und induziert eine Öffnung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen, was ebenfalls einen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg der Zelle bewirkt.

#### **1.4 Assay zum Nachweis funktioneller Antikörper**

Funktionelle Assays sind aufwendig und schwer standardisierbar, weshalb sie für die Routinediagnostik nicht geeignet sind. ELISA-Assays, die Epitope aus dem funktionellen Bereich als Antigen verwenden, sind zwar gut standardisierbar, weisen jedoch nicht unbedingt funktionell aktive Antikörper nach. Mit Zell-basierten Assays können die Zellproliferation, die Toxizität, die Produktion von Markern, die Motilität, die Morphologie und die Aktivierung von Signalwegen gemessen werden [168]. Um Informationen über eine Reaktion auf einen Stimulus zu erhalten, müssen die Zellen vor Zugabe des Stimulus in ihrem normalen physiologischen Zustand gehalten und untersucht werden [169].

In Studien wurden bereits Zell-basierte Bioassays durchgeführt, um die Funktionalität von Aak oder Medikamenten auf ein bestimmtes Epitop zu überprüfen. Doronin et al. entwickelten einen Zell-basierten Bioassay zur Analyse der Aktivität von Anti-PD-1/PD-L1-Ak, der zur Therapie von Krebs eingesetzt wird. Somit konnte ein Bioassay entwickelt werden, der für die Entwicklung therapeutischer Wirkstoffe und Methoden nützlich sein kann [170]. Preuss et al. entwickelten einen Hochdurchsatz-Zell-basierten Bioassay zum zuverlässigen Nachweis von

inhibierenden und stimulierenden funktionellen Aak gegen den mAChR3 bei Patienten mit AID. Mit diesem neu entwickelten Assay können Autoimmunmechanismen bei einer großen Serie von Patienten getestet und möglicherweise neue Therapieoptionen aufgezeigt werden [171].

Zur Durchführung eines Zell-basierten Assay zum Nachweis funktioneller Aak dienen Zellen, die entweder das Zielepitop natürlicherweise exprimieren oder mit einem Plasmid, das für das Zielepitop kodiert, transfiziert werden und das Zielepitop als rekombinantes Protein exprimieren.

Durch die Verfügbarkeit empfindlicher und genauer Fluoreszenzsonden sind exakte Messungen zellulärer und subzellulärer Funktionen möglich geworden [169]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen mit einem Calcium-sensitiven, biolumineszenten Fusionsprotein, bestehend aus GFP (*green fluorescence protein*) und Aequorin, transfiziert. Nach der Aktivierung des AT<sub>1</sub>R durch den AT<sub>1</sub>R-Agonisten ATII wird eine intrazelluläre Kaskade in Gang gesetzt und es kommt zu einem intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Anstieg. Ca<sup>2+</sup> bildet mit Aequorin einen Komplex und führt durch eine intramolekulare Reaktion zur Oxidation von Coelenterazin-h (Luciferin von Aequorin). Das angeregte Coelen-Teramid zerfällt in seinen Grundzustand und emittiert dabei blaues Licht (max. 470 nm). Das blaue Licht regt GFP an, sodass grünes Licht emittiert wird, das luminometrisch gemessen werden kann [172].

## **1.5 Zielsetzung**

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zunächst einen Zell-basierten, zuverlässigen und leicht zu standardisierenden funktionellen Assay zum Nachweis inhibierender oder stimulierender Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper zu etablieren. Ferner sollen die Prävalenz und die Reaktivität von Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern bei Patienten mit SSc mit denen von Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern bei gesunden Probanden und Probanden mit anderen AID verglichen werden. Die getesteten AID umfassen weitere Kollagenosen (M.Sjögren, M.Sharp, SLE) sowie andere rheumatische Erkrankungen (z. B. rheumatoide Arthritis oder Riesenzellerteriitis) sowie verschiedene Lebererkrankungen (primär-biliäre Cholangitis (PBC), primär sklerosierende Cholangitis (PSC), alkoholische Hepatitis, virale Hepatitis, autoimmune Hepatitis (AIH)).

Ferner soll der Einfluss einer aHSZT bei Patienten mit SSc auf das Verhalten funktioneller Anti-AT1R-Ak analysiert werden. Im weiteren Verlauf soll die Reaktivität zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach einer aHSZT mit dem *Outcome* nach der aHSZT verglichen werden, um mögliche prädiktive Marker für eine erfolgreiche aHSZT zu erhalten.

## 2 Patienten und Kontrollen

In dieser Studie wurden Seren von 399 Patienten (siehe Tabelle 6) aus dem rheumatischen Formenkreis (SSc, SLE, *mixed connective tissue disease* (MCTD), SS, rheumatoide Arthritis (RA) und Polymyalgia rheumatica (PM)) untersucht. Ein Teil der SSc-Patienten (n = 28) hat im Rahmen einer Therapie eine aHSZT erhalten. Zudem wurden Seren von Patienten mit autoimmunen Lebererkrankungen (PSC, PBC und AIH) und nicht autoimmunen (viralen, toxischen) Lebererkrankungen untersucht. Als Kontrolle dienten gesunde Probanden.

Die Patienten mit rheumatischen Erkrankungen sind in der Rheumaambulanz der Medizinischen Klinik II (Prof. Dr. Jörg Henes, Dr. Ann-Christin Pecher), die Patienten mit chronischen Lebererkrankungen in der hepatologischen Ambulanz der Medizinischen Klinik I (Prof. Dr. Christoph Berg) in regelmäßiger Betreuung.

Zu verschiedenen Zeitpunkten (Zp) wurden Patienten, bei denen eine autologe Stammzelltransplantation durchgeführt werden sollte bzw. worden war, Serum entnommen.

- Zp0 (Zp0, vor der aHSZT): n = 25
- Zp1 (5 bis 9 Monate nach aHSZT): n = 24
- Zp2 (10 bis 17 Monate nach aHSZT): n = 19
- Zp3 (18 bis 24 Monate nach aHSZT): n = 16

21 Patienten hatten einen günstigen Verlauf nach der aHSZT, bei 7 Patienten war ein Relaps oder Progress nach der aHSZT zu beobachten [155].

Die Seren von gesunden Probanden stammen von Mitarbeitern des Immunpathologischen Labors und Studenten. Die Seren wurden bei -20 °C gelagert. Die vorliegende Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen mit der Nummer 647/2016B02 befürwortet. Zudem entsprach das Studienprotokoll den ethischen Richtlinien der Helsinki Deklaration von 1975.

**Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Patientenseren**

<b>Diagnose</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Altersmedian</b> (Jahre)	<b>Streuung</b> (Jahre)	<b>Geschlecht</b> (w : m)
SSc ohne aHSZT	73	56	17–78	5,6 : 1
SSc mit aHSZT	28	42	19–58	1,2 : 1
Systemischer Lupus erythematoses (SLE)	21	32	15–59	9,5 : 1
<i>mixed connective tissue disease</i> (MCTD)	25	40	10–69	2,6 : 1
Sjögren-Syndrom (SS)	24	46	18–84	23 : 1
rheumatoide Arthritis (RA)	24	61	33–80	3 : 1
<i>Polymyalgia rheumatica</i> (PM)	16	17,5	9–85	1 : 1
autoimmune Lebererkrankungen (PBC, PSC, AIH)	95	47	17–78	2,2 : 1
nicht autoimmune Lebererkrankungen (viral, toxisch)	57	52	20–81	0,6 : 1
gesunde Probanden (GP)	36	25	20–69	1 : 1
<b>gesamt</b>	<b>399</b>			

In Tabelle 7 sind die klinischen Daten der 73 SSc-Patienten aufgeführt

**Tabelle 7: Klinische Parameter der 73 SSc-Patienten**

<b>Klinische Parameter</b>		
Alter zum Zeitpunkt	Mittelwert + SD	54 ± 13
der ersten Manifestation (Jahre)	Median	56
	Range	17–78



Geschlecht	weiblich: Anzahl (%)	62 (85 %)
	männlich: Anzahl (%)	11 (15 %)
Dauer der Erkrankung (Jahre)	Mittelwert + SD	9 ± 6
	Median	7
	Range	0,5–26
Unterform der SSc	lcSSc: Anzahl	52
	dcSSc: Anzahl	21
mRSS	Mittelwert + SD	7,6 ± 7,9
	Median	5
	Range	0–30
<b>Organmanifestationen</b>		
Gesamt (Anzahl)	Mittelwert + SD	3,1 ± 1,8
	Median	3
	Range	0–7 <sup>a)</sup>
Hautmanifestation: Anzahl		62
	Calcinosis: Anzahl	6
	digitale Ulzera: Anzahl	29
Lungenbeteiligung: Anzahl		40
	PAH: Anzahl	14
Ösophagus: Anzahl		39
Muskeln (Myositis): Anzahl		8
Nieren: Anzahl		4
Herz: Anzahl		9

exokrine Drüsen (Sicca-Syndrom): Anzahl		14
<b>Antikörper gegen</b>	Sci70 (Immundiffusion)	22 (30 %)
	Topo I (ELISA)	26 (36 %)
	Zentromere (ACA; IFT)	19 (26 %)
	Nukleoli (Fibrillarin; IFT)	24 (33 %)

a) Vier Patienten hatten keine Organmanifestationen und litten nur an einem Raynaud-Syndrom. Fünf weitere Patienten wiesen zusätzlich eine PBC auf, was sich anhand von cholestatischen Enzymen und dem Vorhandensein anti-mitochondrialer Antikörper vom Anti-M2-Typ, die mit PDC-E2 reagierten, zeigte. Zwei Patienten erhielten eine Leberbiopsie, die eine PBC im Stadium I/II bestätigte.

Die Patientendaten wurden retrospektiv anhand von Arztbriefen und Befunden des Immunpathologischen Labors erhoben.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Eppendorf Safe-Lock Tubes, 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Centrifugal Filter Units 100 kDa	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Zellkulturflasche Nunclon Delta Surface, 75 cm <sup>2</sup>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zellkulturflasche Nunclon Delta Surface, 175 cm <sup>2</sup>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Falcon, 50 ml	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Zellkultur Microplatte, 96 Well, PS, F-Boden, Schwarz Cellstar®	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Zellkultur Microplatte, 96 Well, PS, F-Boden, Weiß Cellstar®	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich

Proteinkit	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
------------	------------------------------------

### 3.1.2 Geräte

Gerätename	Hersteller
Pipetboy 2	Integra Bioscience GmbH Biebertal, Deutschland
Centrifuge 5402	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
MicroBeta <sup>2</sup> LumiJET Microplate Counter inclusive injector	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Odyssey 9120	LI-COR, Lincoln, NE, USA
12-Kanal-Pipette, 10–100 µl	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
pH-Meter pHenomenal TM	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Waage Mettler H 20 T, 0,01–160 g	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Waage Sartorius, 5–820 g	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim vor der Rhön, Deutschland
SORVALL LYNX 4000 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
SORVALL LYNX Ultra 90 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pipette ‚Eppendorf Research plus‘, 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette ‚Eppendorf Research plus‘, 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Pipette ‚Eppendorf Research plus‘, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
8-Kanal-Pipette	Biohit, Helsinki, Finnland
Rollenmischer 348	Assistent, Sondheim vor der Röhn, Deutschland
Photometer (T70/UV/VIS Spektrometer)	PG Instruments Ltd., Leicestershire, United Kingdom

### 3.1.3 Computerprogramme

Programm	Hersteller
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Excel (Version 16.44)	Microsoft, Redmond, WA, USA
Expression Atlas	EBML-EBI, Hinxton, Cambridgeshire, United Kingdom

### 3.1.4 Chemikalien und Reagenzien

#### 3.1.4.1 Chemikalien für den funktionelle AT1R-Assays

Substanz	Hersteller
Coelenterazin-h	Bioton Hayward, CA, USA
Angiotensin II	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
FuGene 6	Promega, Madison, WI, USA
ViaFect	Promega, Madison, WI, USA
Melon™ Gel IgG Spin Purification Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Reagenz ‚ONE-Glo Luciferase Assay‘	Promega, Madison, WI, USA
Glucose	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
HEPES-Puffer	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	VWR Chemicals, Radnor, PA, USA

Magnesiumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
0,4%-Trypanblaulösung	Lonza, Walkersville, MD, USA
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Losartan	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA

#### 3.1.4.2 Immunglobulinpräzipitation aus Patientenserum

Substanz	Hersteller
Melon™ Gel IgG Spin Purification Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ammoniumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

#### 3.1.4.3 Proteinbestimmung (Bradford-Methode)

Substanz	Hersteller
Proteinkit	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

#### 3.1.4.4 SDS-PAGE / Westernblots

Substanz	Hersteller
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
3-Amino-9-ethylcarbazole	SIGMA ALDRICH, Steinheim, Deutschland
Ammoniumpersulfat 10 %	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	SIGMA ALDRICH, Steinheim, Deutschland
Natriumdodecyl-Sulfat (SDS)	SIGMA ALDRICH, Steinheim, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Dimethylformamid	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Tween 20	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Isopropanol 70 %	Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland
2-Mercaptoethanol	SIGMA ALDRICH, Steinheim, Deutschland
Triton® X-100	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Nitrocellulose-Membran	LI-COR, Lincoln, NE, USA
Precision Plus Protein™ Dual Xtra Prestained Protein Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd 37 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

### **3.1.5 Plasmide**

Das GFP-Plasmid wurde freundlicherweise von Prof. Stefan Offermanns, MPI für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim zur Verfügung gestellt.

Das AT<sub>1</sub>R-Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. Beate Preuß, Immunpathologisches Labor, Uniklinik Tübingen zur Verfügung gestellt. Hierbei ist die Sequenz für den Full-Length-AT<sub>1</sub>R in den Vektor „pc DNA 3.1/V5-His TOPO TA“ (Thermo Fisher Scientific) einkloniert. Zur Verifizierung wurde das AT<sub>1</sub>R-Insert sequenziert (Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland).

Das pGL3-NFAT Luciferase Plasmid wurde freundlicherweise von Jerry Crabtree zur Verfügung gestellt (Addgene Plasmid # 17870; [http://n2t.net/addgene:17870;RRID:Addgene\\_17870](http://n2t.net/addgene:17870;RRID:Addgene_17870)).

<b>Plasmid</b>	<b>Hersteller</b>
pGL3-NFAT-Luciferase-Plasmid	Addgene, Watertown, MA, USA

### **3.1.6 Antikörper für die Westernblots**

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
<b>primäre Antikörper</b>	
Angiotensin-2-Typ-1A-Rezeptor-Antikörper	Bioss, Woburn, MA, USA
<b>sekundäre Antikörper</b>	
IRDye 800CW (donkey) anti-rabbit IgG	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA

### **3.1.7 Zellen**

<b>Zelllinie</b>	<b>Hersteller</b>
Huh-7	CLS Cell Lines Service, Eppenheim, Deutschland
TFK-1	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
CHO-K1	DSMZ, Braunschweig, Deutschland

### **3.1.8 Zellkulturmedium bzw. -reagenzien**

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Gibco Hanks Balance Salt Solution (HBSS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gibco DMEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Gibco F-12 Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gibco Trypsin-EDTA	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gibco FCS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
GlutaMAX (100x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
G418 Sulfat	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Streptomycin	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Refobacin 80 mg (Injektionslösung)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
cOmplete Mini (Protease-Inhibitor)	Roche Diagnostics, Mannheim Deutschland
RPMI 1640	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland

## 3.2 Puffer und Lösungen

### 3.2.1 SDS-PAGE

- Trenngel (12 % Polyacrylamid für vier Gele)
  - 13,8 ml Aqua dest.
  - 16,8 ml Rotiphorese Gel 30
  - 10,5 ml Tris (1,5 M; pH 8,8)
  - 420 µl 10%ige SDS-Lösung
  - 420 µl 10%ige Ammoniumpersulfat-Lösung
  - 42 µl TEMED
- Sammelgel (5 % Polyacrylamid für vier Gele)
  - 13,2 ml Aqua dest.
  - 3,3 ml Rotiphorese Gel 30
  - 2,5 ml Tris (1 M; pH 8,8)
  - 195 µl 10%ige SDS-Lösung
  - 195 µl 10%ige Ammoniumpersulfat-Lösung



- 19,5 µl TEMED
- Elektrodenpuffer
  - 5 g SDS
  - 30,25 g Tris
  - 112,5 g Glycin
  - Ad 5 l Aqua dest.
- SDS-Puffer (zweifach konzentriert)
  - 0,485 g Tris
  - 2 g SDS
  - 5 ml Mercaptoethanol
  - 10 ml Glycerin
  - 1 ml Bromphenolblau (1 %, w/v)
  - Ad 24 ml H<sub>2</sub>O

### **3.2.2 Odyssey-NIR-Westernblot**

- Transferpuffer
  - 2 g SDS
  - 6,06 g Tris
  - 28,82 g Glycin
  - Ad 1,2 l Aqua dest.
  - Ad 2 l mit Methanol
- PBS-Puffer pH 7,4
  - 43,83 g NaCl
  - 44,49 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - 6,81 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - Ad 5 l Aqua dest.
- Blockierlösung (BL)
  - 3 % (w/v) BSA in PBS
- Antikörper-Verdünnungspuffer (AKV)
  - PBS mit 3 % (w/v) BSA und 0,2 % (v/v) Tween-20
- Waschpuffer (WP)
  - PBS mit 0,1 % (v/v) Tween-20

### **3.2.3 In-Zell-Westernblot**

- *Fixing-Solution*
  - PBS (siehe Kap. 3.2.2)
  - PBS mit 3,7 % (v/v) Formaldehyd
- *Permeabilization-Solution*
  - PBS mit 0,1 % (v/v) Triton X

### **3.2.4 Zellkulturmedien**

- **CHO-K1-Zellkulturmedium**
  - Ham's F-12
  - 10 % (v/v) fetales Kälberserum (FCS)
  - 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (100-fach)
  - 300 µg/ml G418 Sulfat
- **HUH-7-Zellkulturmedium**
  - DMEM
  - 10 % (v/v) FCS
  - 1 % GlutaMAX
  - 0,16 mg/ml Refobacin
- **TFK-1-Zellkulturmedium**
  - 500 ml RPMI 1640
  - 10 % (v/v) FCS
  - 0,16 mg/ml Refobacin

### **3.2.5 AT1R-Assay**

- HBSS mit und ohne Ca<sup>2+</sup>
  - 120 mM NaCl
  - 5,4 mM KCl
  - 0,8 mM MgSO<sub>4</sub>
  - 10 mM Glukose
  - 10 mM Hepes
  - (2 mM CaCl<sub>2</sub>)
  - Lösung mit NaOH auf pH 7,4 einstellen

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Zelllinien

Um die Effekte funktioneller Aak auf den AT<sub>1</sub>R zu untersuchen, wurden Versuche mit drei Zelllinien (CHO-K1, Huh-7, TFK-1) durchgeführt. Die Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO-K1) sind stabil mit einem GFP/Aequorin-Plasmid transfiziert. Die Huh-7-Zellen entstammen einem humanen hepatozellulären Karzinom und exprimieren auf ihrer Oberfläche den AT<sub>1</sub>R [173]. Die TFK1-Zellen stammen aus einem humanen biliären duktalem Karzinom und exprimieren weder den AT<sub>1</sub>R noch GFP.

##### 3.3.1.1 CHO-K1

Bei den Ovarialzellen des chinesischen Hamsters handelt es sich um eine Zellreihe, die im Jahre 1957 von Theodore Puck aus den Eierstöcken eines chinesischen Hamsters isoliert wurde. Nach Auftauen der Zellen wurden diese in einer 75 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflasche in CHO-K1-Medium angezüchtet. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Ab einer Zelldichte von ca. 90 % wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden mit Hanks-Balance-Salt-Solution (HBSS) gespült sowie mithilfe von EDTA-Trypsin abgelöst. Die Zellen wurden im Verhältnis 1 : 4 bis 1 : 6 auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

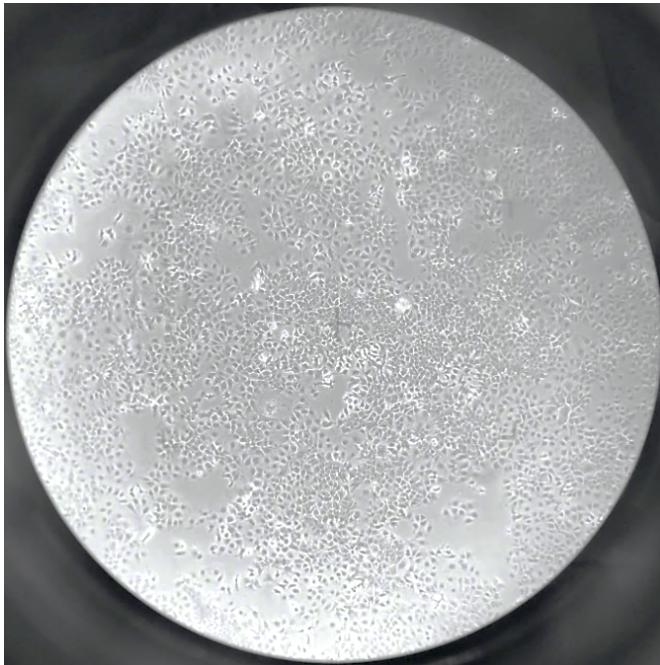
Zur Kryokonservierung der Zellen wurden diese mit HBSS und EDTA-Trypsin abgelöst und abzentrifugiert (360 g, 10 min). Danach wurden die Zellen in Einfriermedium (40 % Ham's F-12, 50 % FCS, 10 % DMSO) aufgenommen und mit einer Zelldichte von ca. 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml bei -80 °C eingefroren.

Zum Auftauen wurden die Zellen rasch in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in eine mit Medium befüllte Zellkulturflasche überführt. Nach 4 bis 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, da das DMSO das Zellwachstum negativ beeinflusst.

### 3.3.1.2 Huh-7

Huh-7 sind eine Zelllinie, die aus einem hepatozellulären Karzinom eines 57 Jahre alten männlichen Japaners im Jahre 1982 gewonnen wurde [174]. Huh-7 exprimieren den AT<sub>1</sub>R, jedoch kein GFP [173].

Die Zellen wurden nach dem Auftauen auf einer 75 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflasche mit DMEM-Zellkulturmedium (siehe Kap. 3.2.4) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> herangezogen. Das Medium wurde alle drei bis vier Tage gewechselt und ab einer Zelldichte von ca. 80 % bis 90 %, wie in Abbildung 1 zu sehen, wurden die Zellen auf mehrere Zellkulturflaschen separiert.



**Abbildung 1: Huh-7-Zellen mit einer Konfluenz von ca. 80 %, durch das Mikroskop fotografiert (Quelle: Eigene Darstellung).**

Die Kultivierung und das Auftauen der Zellen wurden analog zu den CHO-K1 (siehe Kap. 3.3.1.1.) mit Huh-7-Medium (siehe Kap. 3.2.4) durchgeführt.

### 3.3.1.3 TFK-1-Zellen

Die TFK-1 Zellen wurden aus einem extrahepatischen cholangiozellulären Karzinom eines 64 Jahre alten Japaners isoliert. Die Zellen wurden mit RPMI-1640-Medium (siehe Kap. 3.2.4) kultiviert. Die TFK-1-Zellen exprimieren weder GFP

noch den AT<sub>1</sub>R und dienten als Kontroll-Zellreihe. Die Zellen wurden analog zu den CHO-K1 kultiviert (siehe Kap. 3.3.1.1).

### **3.3.2 Präzipitation von Immunglobulinen aus Patientenseren mittels Ammoniumsulfat und Melon™ Gel IgG Purification Kit**

Die Isolierung von Immunglobulinen aus Patientenseren wurde über Ammoniumsulfat(AS)-Präzipitation oder mit dem Melon™ Gel Purification Kit durchgeführt. Die isolierten Immunglobuline wurden in den funktionellen Assays verwendet. Die Ergebnisse beider Verfahren wurden miteinander verglichen.

#### **Ammoniumsulfat-Fällung**

Das Patientenserum wurde mit gesättigter AS-Lösung (756,1 g/l H<sub>2</sub>O) im Verhältnis 1 : 1 tropfenweise vermischt und über Nacht bei 4 °C gelagert. Die Probe wurde bei 5000 xg für 30 Minuten zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Präzipitat wurde zweimal mit 60%iger AS-Lösung (389,8 g/l H<sub>2</sub>O) gewaschen und jeweils bei 5000 X g für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils verworfen. Das Pellet wurde in dem ursprünglichen Volumen an Patientenserum in HBSS gelöst. Die isolierten Ig wurden bei –20 °C gelagert.

#### **Melon™ Gel Purification Kit**

Die Isolierung von Ig aus Patientenseren mittels Melon™ Gel Purification Kit wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die gewonnenen Ig wurden mit HBSS auf ihr ursprüngliches Volumen aufgefüllt und bei –20 °C gelagert.

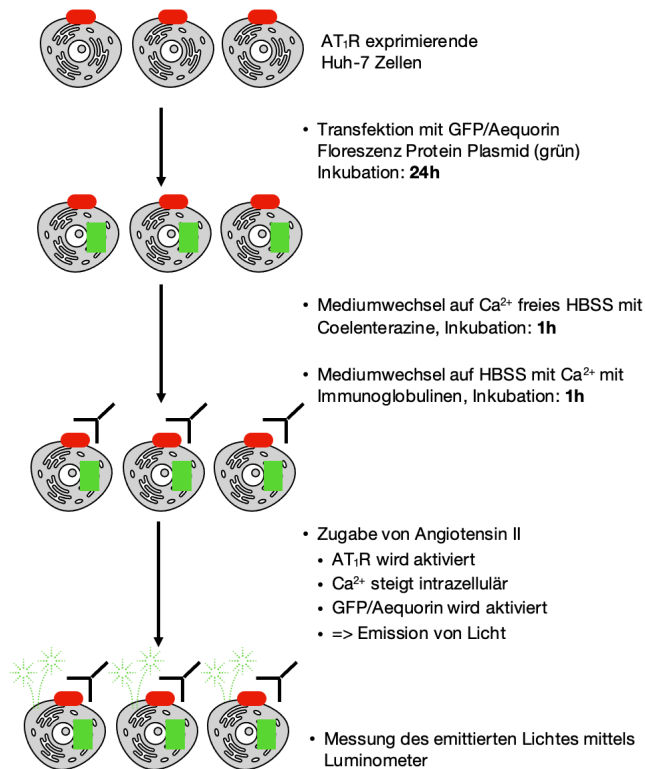
### **3.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der mit AS gefällten Ig (siehe Kap. 3.1.4.2) wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

### **3.3.4 Funktioneller Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptor-Assay**

Der funktionelle AT<sub>1</sub>R-Assay dient dem Nachweis stimulierender oder inhibierender funktioneller Aak aus Patientenseren anhand einer schnellen Zellantwort in Form eines Ca<sup>2+</sup>-Anstiegs. Mithilfe einer chemischen Reaktion des Aequorin/GFP mit Ca<sup>2+</sup> wurde der Einfluss von Aak auf den AT<sub>1</sub>R luminometrisch

gemessen (siehe Abbildung 2). Der Assay wurde mit den Zelllinien CHO-K1, TFK-1 und Huh-7 durchgeführt.



**Abbildung 2: Skizze des Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptor-Assay mit Huh-7-Zellen**

Die Huh-7-Zellen exprimieren den AT<sub>1</sub>R (hier rot dargestellt) auf ihrer Plasmamembran. Die Huh-7-Zellen wurden mit einem GFP/Aequorin-Plasmid transfiziert und anschließend für 24 Stunden inkubiert. Als die Huh-7-Zellen nun auch das GFP/Aequorin (hier grün dargestellt) exprimierten, wurde das Medium gewechselt. Zuerst wurde das alte Medium verworfen und Ca<sup>2+</sup>-freies HBSS zusammen mit Coelenterazin-h hinzugegeben. Nach einer Stunde Inkubation wurde das Medium gegen HBSS mit Ca<sup>2+</sup> und Immunglobulinen ausgetauscht und wiederum für eine Stunde inkubiert. Während der Zugabe von ATII wurde das emittierte Licht mittels Luminometer gemessen. Der Einfluss der Ig wurde anhand von Huh-7-Zellen bestimmt, denen keine Ig hinzugefügt wurden.

### 3.3.4.1 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. 20 µl Zellsuspension wurden mit 20 µl Trypanblaulösung gemischt und auf die Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Die Auswertung erfolgte am Inversmikroskop (6,3-x-Objektiv). Tote Zellen nehmen Trypanblau auf und erscheinen blau, lebende Zellen bleiben farblos. Für die Berechnung der Zellzahl pro ml gilt:

$$\frac{x}{4} * 2 * 10^4 = \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}}$$

**Formel 1: Ermittlung der Zellzahl pro ml**

x = Summe der ausgezählten Zellen in vier Großquadranten. Der Mittelwert wurde mit dem Faktor 2 multipliziert, da die Zellsuspension durch Trypanblau um den Faktor 2 verdünnt wurde.

**3.3.4.2 Ausplattieren der Zellen auf eine 96-Well-Platte**

Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von  $10^4$  Zellen/Well auf eine Zellkultur-Microplatte (96 Well, PS, F-Boden, weiß) ausplattiert. Die 96-Well-Platte wurde in Alufolie gewickelt und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 24 Stunden sollten die Zellen für die Transfektion eine Zelldichte von ca. 80 bis 90 % erreicht haben. Dies wurde unter dem Mikroskop optisch begutachtet.

**3.3.4.3 Transfektion**

Die CHO-K1 wurden mit einem AT<sub>1</sub>R -Plasmid, die TFK-1 und Huh-7 mit einem Aequorin/GFP-Plasmid transfiziert. Die CHO-K1 wurden im Folgenden als ‚CHOG5A‘ bezeichnet.

**Transfektion von CHOG5A mit AT<sub>1</sub>R-Plasmid**

Die Transfektion mit dem AT<sub>1</sub>R-Plasmid wurde gemäß Herstellerangaben (Promega) durchgeführt. Zur Bestimmung des optimalen Verhältnisses von FuGene 6 zu Plasmid wurde die Transfektion mit mehreren Verhältnissen von FuGene 6 zu Plasmid (6 : 1, 2 : 1 und 3 : 1 µl : µg) vorgenommen. Die transfizierten Zellen wurden in Alufolie eingewickelt und für 48 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zelldichte der 96-Well-Platte wurde unter einem Inversmikroskop nach 24 Stunden überprüft.

**Transfektion von TFK-1 mit Aequorin/GFP-Plasmid**

Die Transfektion dieser Zelllinie mit dem Aequorin/GFP-Plasmid wurde gemäß Herstellerangaben (Promega) durchgeführt. Es wurde ein FuGene-6-zu-Plasmid-Verhältnis von 2 : 1 (µl : µg) gewählt. Die weiteren Schritte erfolgten analog zu denen der CHO-K1.

### **Transfektion von Huh-7 mit Aequorin/GFP-Plasmid**

Die Huh-7-Zellen wurden in einem Falcon-Röhrchen transfiziert. Zum Erstellen des Transfektionsansatzes wurde serumfreies DMEM mit FuGene 6 vermischt und 5 Minuten inkubiert. Aequorin/GFP-Plasmid wurde in SF DMEM verdünnt, zum Transfektionsansatz hinzugegeben und für 20 Minuten inkubiert. Das Verhältnis von FuGene 6 zu DNA betrug 2 : 1.

Der Transfektionsansatz wurde zur Zellsuspension ( $10^5$  Z/ml) im Falcon-Röhrchen hinzugegeben und eine Stunde auf einem Rollenmischer inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit einer Zelldichte von  $10^4$  Zellen/Well auf eine Zellkultur-Microplatte (96 Well, PS, F-Boden, weiß) ausplattiert (siehe Kap. 3.3.4.2). Zur Kontrolle wurden ebenfalls nicht transfizierte Zellen ausplattiert. Die Platte wurde in Alufolie gewickelt und für 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen sollten nach 48 Stunden eine Zelldichte von 80 bis 90 % pro Well aufweisen.

#### **3.3.4.4 AT<sub>1</sub>R-Assay**

Der AT<sub>1</sub>R Assay dient dem Nachweis funktioneller Aak aus Patientenseren. Die Aktivierung des AT<sub>1</sub>R durch den Agonisten ATII induziert einen intrazellulären Calciumanstieg. Das freigesetzte Ca<sup>2+</sup> induziert wiederum eine Konformationsänderung von Coelenterazin-h zu Coelenteramid, das instabil ist und durch eine Decarboxylierung wieder in seine ursprüngliche Konformation unter Abgabe eines Photons zerfällt. Das dabei entstandene Photon wird auf GFP übertragen, das ebenfalls in einen instabilen Zustand übergeht. Sobald das angeregte GFP wieder in seinem Grundzustand zurückreagiert, wird grünes Licht mit einer Wellenlänge von 509 nm emittiert [172]. Dieses grüne Licht wurde luminometrisch gemessen.

Zur Messung wurde das Medium von der 96-Well-Platte entfernt und die Zellen wurden mit 5 µM Coelenterazin-h in HBSS ohne Ca<sup>2+</sup> für eine Stunde, in Alufolie eingewickelt, bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurden die Platten ausgeklopft und HBSS mit Ca<sup>2+</sup> und AS-gefällten Patientenseren (Endverdünnung von 1 : 100) wurde zugegeben. Weiterhin wurde anstelle der Antikörper der



AT<sub>1</sub>R-Antagonist Losartan zusammen mit HBSS und Ca<sup>2+</sup> zu den Zellen hinzugefügt. Die Platte wurde erneut in Alufolie gewickelt und eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Während der Messung wurden nach einer Sekunde 10 µl einer 10-µM-ATII-Lösung in HBSS mit Ca<sup>2+</sup> pro Well injiziert und die relative Lichteinheit (RLU) wurde für 10 Sekunden pro Well luminometrisch gemessen [175].

### **3.3.5 Luciferase-Assay**

Der Luciferase-Assay wurde zum Nachweis stimulierender oder inhibierender Aak gegen den AT<sub>1</sub>R auf Grundlage der Arbeit von Alfredo Leañós-Miranda entwickelt [176]. Anders als bei dem in Kapitel 3.3.4 beschriebenen Assay wurde hier nicht die schnelle Zellantwort in Form eines intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Anstieges gemessen, sondern die späte Zellantwort in Form von zellulärer Transkription. Das pGL3-NFAT-Plasmid, das von Jerry Crabtree zur Verfügung gestellt worden war (Addgene Plasmid #17870; [http://n2t.net/addgene:17870;RRID:Addgene\\_17870](http://n2t.net/addgene:17870;RRID:Addgene_17870)), beinhaltet eine Dreifachkassette der NFAT(*nuclear factor of activated T-cell*)-Bindesequenz gefolgt von der Sequenz für Luciferase. Die Transkription des Luciferase-Gens wurde unter der Kontrolle des Promoters NFAT gesteuert [177]. In diesem Assay diente das pGL3-NFAT-Plasmid der Untersuchung des Einflusses funktioneller AT<sub>1</sub>R-Antikörper auf die Signaltransduktion des AT<sub>1</sub>R durch Ca<sup>2+</sup>, Calcineurin und NFAT. Mithilfe des One-Glow-Luciferase-Substrates lässt sich die Luciferase-Aktivität am Luminometer messen. Eine Aktivierung oder Hemmung der Zellen durch Ig oder ATII induziert somit eine vermehrte oder verminderte Transkription des Luciferase-Plasmids.

Der Luciferase-Assay wurde mit den Zelllinien CHO-K1 und Huh-7 durchgeführt. Die Ausführung war bis auf die Transfektion (siehe Kap. 3.3.5.2) bei beiden Zellreihen analog.

#### **3.3.5.1 Ausplattieren der Zellen auf eine 96-Well-Platte**

Die Zellen (CHO-K1 oder Huh-7) wurden mit einer Zelldichte von 10<sup>4</sup> Zellen/Well in eine Zellkultur-Microplatte (96 Well, PS, F-Boden, schwarz) ausplattiert und in

Alufolie bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 24 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden nach der Inkubationszeit durch ein Inversmikroskop begutachtet.

#### 3.3.5.2 Transfektion

##### **Transfektion Huh-7**

Die Huh-7 exprimieren den AT<sub>1</sub>R, jedoch keine Luciferase, weshalb die Zellen mit einem pGL3-NFAT-Luciferase-Plasmid transfiziert wurden [173]. Dies geschah gemäß Herstellerangaben mit FuGene 6 und dem pGL3-NFAT-Luciferase Plasmid in einem Verhältnis von 3 : 1 (FuGene 6 : pGL3-NFAT-Luciferase-Plasmid). Die 96-Well-Platte wurde in Alufolie gewickelt und für 5 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

##### **Transfektion CHO-K1**

Die CHO-K1 exprimieren weder den AT<sub>1</sub>R noch Luciferase, weshalb die Zellen mit einem AT<sub>1</sub>R-Plasmid und pGL3-NFTA-Luciferase-Plasmid co-transfiziert wurden. Die Transfektion wurde gemäß Herstellerangaben mit FuGene 6 durchgeführt. Die Zellen wurden mit einem FuGene-6-zu-Plasmid-Verhältnis von jeweils 3 : 1 co-transfiziert. Analog zu der Transfektion der Huh-7-Zellen wurden die CHO-K1 inkubiert.

#### 3.3.5.3 Inhibition bzw. Aktivierung der Zellen

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde Zellkulturmedium mit 20 % FCS hinzugegeben, wodurch sich die Endkonzentration von FCS im Well auf 12,5 % erhöhte. Die 96-Well-Platte wurde für 18 Stunden in Alufolie bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde das Medium gegen serumfreies Medium (SFM) ausgetauscht und die 96-Well-Platte für 24 Stunden in Alufolie bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Nach 24 Stunden wurden die Zellen unter einem Inversmikroskop betrachtet. Jedes Well sollte zu 80 bis 90 % mit Zellen bewachsen sein. AS-gefällte Ig aus Patientenserum wurden in einer Endverdünnung von 1 : 40 hinzugegeben und nach einer Stunde wurden 2 µM ATII-Lösung (verdünnt in HBSS mit Ca<sup>2+</sup>)

hinzugefügt. Zur Validierung des AT<sub>1</sub>R wurde in weiteren Versuchen Losartan nach ATII (ohne die Zugabe von Ig) ergänzt.

Es folgte eine 24-stündige Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

#### 3.3.5.4 Messung

Die Messung der Luciferase-Aktivität erfolgte gemäß Herstellerangaben des One-Glow-Reagenz-Lysis-Puffers. Die Zellen wurden mittels One-Glow-Reagenz-Lysis-Puffer lysiert. Nach 3 Minuten wurde die RLU jedes Wells für 10 Sekunden luminometrisch gemessen. Nicht transfizierte Zellen dienten als Kontrolle.

#### **3.3.6 Plasmamembran-Isolierung**

Der Nachweis der Expression von AT<sub>1</sub>R auf der Plasmamembran der Huh-7-Zellen erfolgte mit isolierten Plasmamembranen in einem In-Zell- und Odyssey Westernblot. Die abgelösten Zellen von drei konfluent bewachsenen 175-cm<sup>2</sup>-Schalen wurden bei 360 X g für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde zweimal in HBSS gewaschen. Das Pellet wurde in eiskalten HBSS (mit Protease-Inhibitor) aufgenommen und zehnmal auf Eis gepottert und anschließend sechsmal für 15 Sekunden sonifiziert. Die Lösung wurde für eine Stunde bei 4 °C und 100 000 X g zentrifugiert. Die gewonnene Plasmamembran wurde in HBSS inklusive Protease-Inhibitor gelöst und bei -20 °C gelagert.

#### **3.3.7 Westernblot-Analysen**

Der Westernblot dient dem Nachweis von Proteinen. Zunächst wurden die Proteine mittels einer SDS-PAGE (siehe Kap. 3.3.7.1) dem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt und dann auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden mithilfe von BSA geblockt. Die spezifischen Proteine wurden daraufhin mit einem Protein-spezifischen Primär-Ak und einen Primär-Ak-bindenden Sekundär-Ak sichtbar gemacht.

In dieser Arbeit dienten der Odyssey- sowie der In-Zell-Westernblot der Validierung des AT<sub>1</sub>R auf der Plasmamembran der Huh-7-Zellen. Im Odyssey-

Westernblot wurden isolierte Huh-7-Plasmamembranen als Antigen verwendet, wohingegen beim In-Zell-Westernblot vitale Huh-7-Zellen genutzt wurden.

#### 3.3.7.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli

Die SDS-PAGE ist ein biochemisches Verfahren zum Auftrennen von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht, wobei die Proteine durch ein Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt werden.

Die benötigten Trenngele wurden nach Rezept (siehe Kap. 3.2.1) angefertigt, mit Isopropanol beschichtet und für 15 Minuten auspolymerisiert. Im Anschluss wurden die Sammelgele hergestellt (siehe Kap. 3.2.1). Das Isopropanol wurde entfernt und die Trenngele mit Aqua dest. gespült. Daraufhin wurde die Sammelgellösung auf die Trenngele pipettiert. Die Kämme wurden eingesetzt und das fertige Polyacrylamidgel für 15 Minuten auspolymerisiert.

Die isolierte Huh-7-Plasmamembran (siehe Kap. 3.3.6) wurde in einem Verhältnis von 1 : 1 mit SDS-Ladepuffer (zweifach konzentriert) vermischt. Zum Vergleich wurde ein Teil der Plasmamembran zusammen mit dem SDS-Ladepuffer für 4 Minuten im Wasserbad gekocht.

Für den Elektrophorese-Lauf wurde das Polyacrylamidgel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die Kammer wurde mit Elektrophorese-Puffer (siehe Kap. 3.2.1) befüllt. In die erste Tasche des Polyacrylamidgels wurden 2 µl Molekularmarker *Precision Plus Protein Dual Color* pipettiert. In die weiteren Taschen wurden 20 µl der vorbereiteten Huh-7-Plasmamembran gegeben. Es wurde eine elektrische Spannung von 50 V für 5 Minuten, von 100 V für 10 Minuten und von 200 V angelegt, bis die Proteine zum Boden des Polyacrylamidgels gelaufen waren.

#### 3.3.8 Odyssey-Westernblot

Für den Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran wurde das Polyacrylamidgel zusammen mit einer Nitrocellulose-Membran, Filterpapieren und Transferschwämmen in eine Transferkassette eingespannt und in eine Transferkammer eingebaut. Diese wurde mit Transferpuffer (siehe Kap. 3.2.2) befüllt und für eine Stunde mit einer Spannung von 100 V versetzt.

Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrocellulose-Membran eine Stunde lang in Blockierlösung (siehe Kap. 3.2.2) geschwenkt und anschließend mit einem primären AT<sub>1</sub>R-Ak (verdünnt mit AKV 1 : 500; siehe Kap. 3.2.2) eine Stunde lang inkubiert. Daraufhin wurde die Nitrocellulose-Membran viermal für je 5 Minuten in WP (siehe Kap. 3.2.2) gewaschen. Im nächsten Schritt wurde die Nitrocellulose-Membran in 5 ml des 1 : 1000 mit AKV verdünnten IRDye-800CW-(Donkey-)Anti-Rabbit-IgG für eine Stunde lichtgeschützt inkubiert. Die Nitrocellulose-Membran wurde erneut in WP viermal für je 5 Minuten gewaschen, in PBS geschwenkt und lichtgeschützt getrocknet.

Die Nitrocellulose-Membran wurde mit einer Auflösung von 169 µm, einem Offset-Fokus von 0 mm und einer medium Qualität im Odyssey 9120 gemessen.

### ***3.3.9 In-Zell-Westernblot von Huh-7 mit Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptor-Antikörpern***

Die Durchführung des In-Zell-Westernblots wurde gemäß Herstellerprotokoll ‚In-Cell Western Assay‘ (LI-COR Bioscience) durchgeführt. Beide im Protokoll genannten Methoden zur Fixierung (Formaldehyd/Triton X-100 und Methanol) wurden angewendet. Zudem wurde ein Nativ-Versuch ohne Fixierung mit Formaldehyd/Triton X-100 und Methanol durchgeführt.

Die Auflösung (169 µm), der Offset-Fokus (3 mm) und die Scan-Qualität (hoch) wurden zur Messung im Odyssey 9120 eingestellt. Es wurde bei einer Wellenlänge von 800 nm gemessen.

### ***3.3.10 Statistische Auswertung***

In den funktionellen Assays wurden die zu analysierenden Patienten vierfach bestimmt. Die gemessenen RLUs wurden mit dem Ausreißer-Test nach Grubbs getestet [178]. Die Ausreißer wurden nicht in die Berechnung des Mittelwertes einbezogen.

Zur Normalisierung der funktionellen Assays wurde der Anteil der gemessenen RLUs unter Zugabe von Ig in Bezug auf die RLUs ohne Zugabe von Ig als Prozentsatz berechnet und als %RLU angegeben.

Um einen Normbereich im funktionellen AT<sub>1</sub>R-Assay zu bestimmen, wurde die Calciumfreisetzung als RLU unter Einfluss von Ig (Vierfach-Bestimmung) gemessen und als Prozentsatz der RLU (%RLU) ohne zugesetzte Ig angegeben. Zur Bestimmung des Normbereich wurden die Ig von 36 gesunden Probanden analysiert und der Mittelwert der %RLU wurde berechnet. Die RLU von Patienten und Kontrollen wurde durch den Mittelwert der gesunden Probanden geteilt, um einen Faktor zu berechnen. Ein Faktor von mehr als 1,4 wurde als stimulierende Aktivität, ein Faktor kleiner als 0,6 als hemmende Aktivität definiert.

Für die statistische Auswertung wurden GraphPad Prism 7 und Excel 16.44 verwendet. Es wurden nicht parametrische Tests eingesetzt. Ungepaarte Daten wurden durch Mann-Whitney-U-Tests und gepaarte Daten durch Wilcoxon-Tests analysiert. Zum Vergleich der Prävalenz wurde der Exakte Fisher-Test verwendet. Der Spearman-Rank-Test für nicht parametrische Analysen wurde zur Bewertung der Korrelationen genutzt. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert von unter 0,05 festgelegt.

## **4 Ergebnisse**

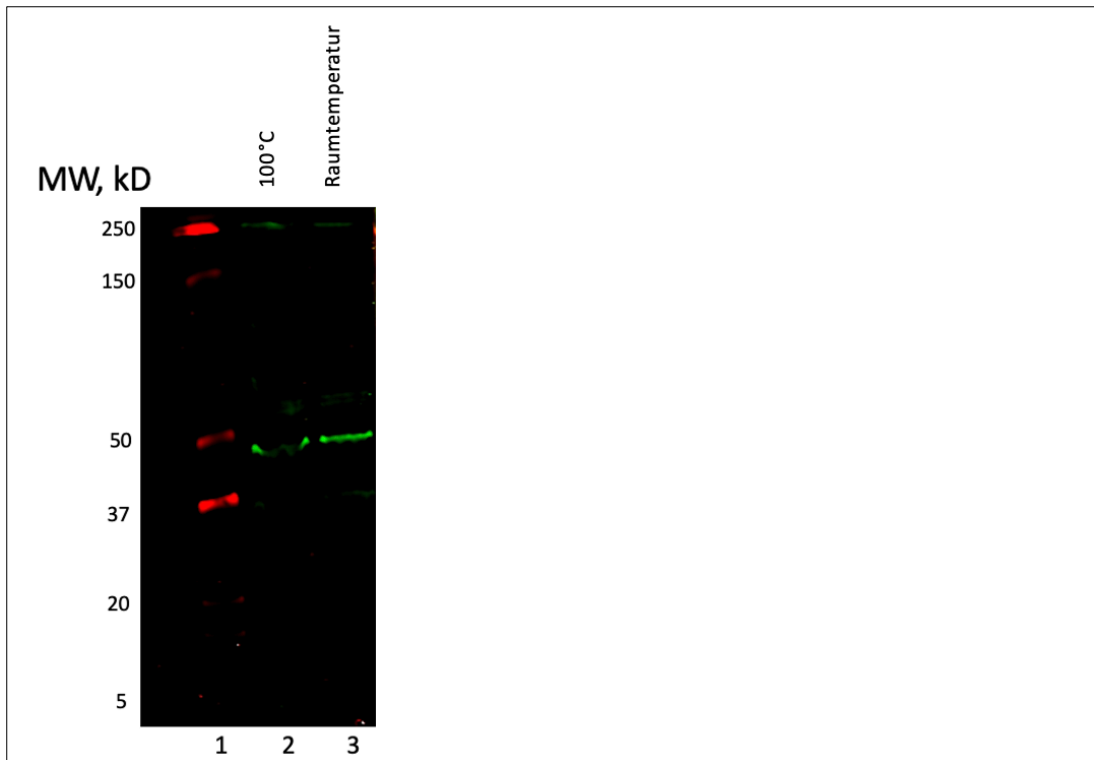
### **4.1. Nachweis des AT<sub>1</sub>R auf Huh-7-Zellen**

Laut dem Uniprot-Eintrag für den humanen AT<sub>1</sub>R (Uniprot-ID P30556) exprimieren Huh-7-Zellen den AT<sub>1</sub>R auf der Plasmamembran. Zur Überprüfung wurde ein Odyssey-Westernblot der isolierten Huh-7-Plasmamembran und ein In-Zell-Westernblot von Huh-7-Zellen angefertigt.

#### ***4.1.1 Odyssey-Westernblot zum Nachweis des AT<sub>1</sub>R auf der Plasmamembran der Huh-7-Zellen***

Zum Nachweis der Expression des AT<sub>1</sub>R auf der Plasmamembran der Huh-7-Zellen wurde ein Odyssey-Westernblot der Plasmamembran der Huh-7-Zellen wie in Kapitel 3.3.8 beschrieben durchgeführt. Es konnte eine Bande bei ca. 48 kDa nachgewiesen werden. Dies entspricht den Westernblot-Analysen des Herstellers (Bioss) und weiteren Studien [179, 180]. Das Molekulargewicht des AT<sub>1</sub>R beträgt laut Uniprot 41 kDa (siehe Abbildung 3) [181]. Ebenfalls ist anhand

des Odyssey-Westernblots ersichtlich, dass die Probe, die nach dem Vermischen mit SDS-PAGE nicht gekocht wurde, ein besseres Signal aufweist als die gekochte Probe.

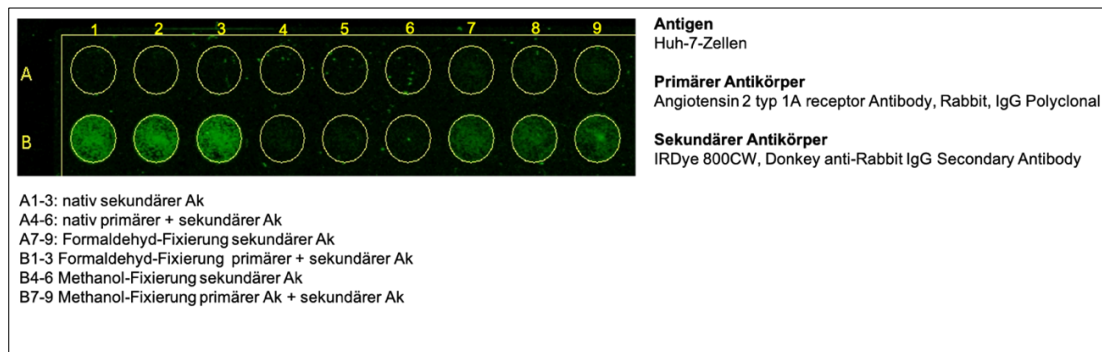


**Abbildung 3: Odyssey-Westernblot mit Huh-7-Plasmamembranen und Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper**  
Spur 1: Molekularmarker Precision Plus Protein Dual Color; Spur 2: Huh-7-Plasmamembranen (4 Minuten gekocht); Spur 3: Huh-7-Plasmamembran mit SDS-PAGE (nicht gekocht); primärer AK: Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper (Immunogen AS 101-200 des AT<sub>1</sub>R; Bioss); sekundärer Ak: IRDye-800CW-Donkey-Anti-Rabbit-Antikörper (LI-COR, Lincoln, NE, USA)

#### **4.1.2 In-Zell-Westernblot mit einem Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptor-Antikörper (Biotec)**

Zur weiteren Validierung der Expression des AT<sub>1</sub>R auf den Huh-7-Zellen wurde ein In-Zell-Westernblot durchgeführt (siehe Kap. 3.2.3). Die Huh-7-Zellen wurden mit Methanol oder Formaldehyd fixiert und permeabilisiert. Es wurden auch native Huh-7-Zellen ohne Fixierung und Permeabilisation getestet.

Formaldehyd- oder Methanol-fixierte Huh-7-Zellen führten zu spezifischen Signalen, wohingegen sich bei den Kontrollen keine Signale ergaben (siehe Abbildung 4)



**Abbildung 4: In-Zell-Westernblot mit unfixierten und Formaldehyd- bzw. Methanol-behandelten Huh-7-Zellen**

AT<sub>1</sub>R-Signale sind in Methanol-behandelten Huh-7-Zellen (schwaches Signal) und FA-behandelten Huh-7-Zellen (starkes Signal) messbar. Die Kontrollen (nur sekundärer AK) und die native Zelle zeigen keine Signale.

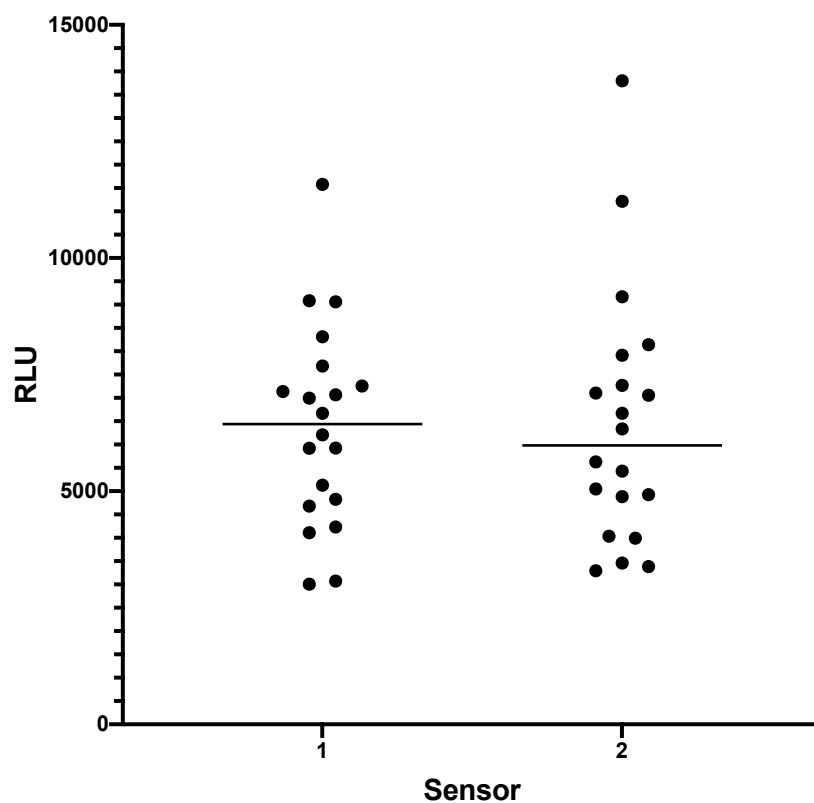
## 4.2 Optimierung des AT<sub>1</sub>R-Assay mit CHOG5A-Zellen

Der Assay wurde auf der Grundlage der Arbeit von Preuss et al. [171], in deren Rahmen der Einfluss funktioneller Aak gegen den Acetylcholin-M3-Rezeptor untersucht wurde, optimiert und durchgeführt. In den nachfolgenden Optimierungsschritten wurden Variablen und Konzentrationen zum Nachweis funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper in Patientenseren variiert.

### 4.2.1 Überprüfung der Vergleichbarkeit der Sensoren

Der MicroBeta<sup>2</sup> LumiJET besitzt zwei Detektoren, die unabhängig voneinander messen. Detektor 1 misst die Reihen A–D, Detektor 2 die Reihen E–H der 96-Well-Platte. Zum Abgleich der beiden Detektoren wurden die RLUs des Assays miteinander verglichen. Die Überprüfung ergab keine relevanten Messunterschiede zwischen beiden Detektoren (siehe Abbildung 5).



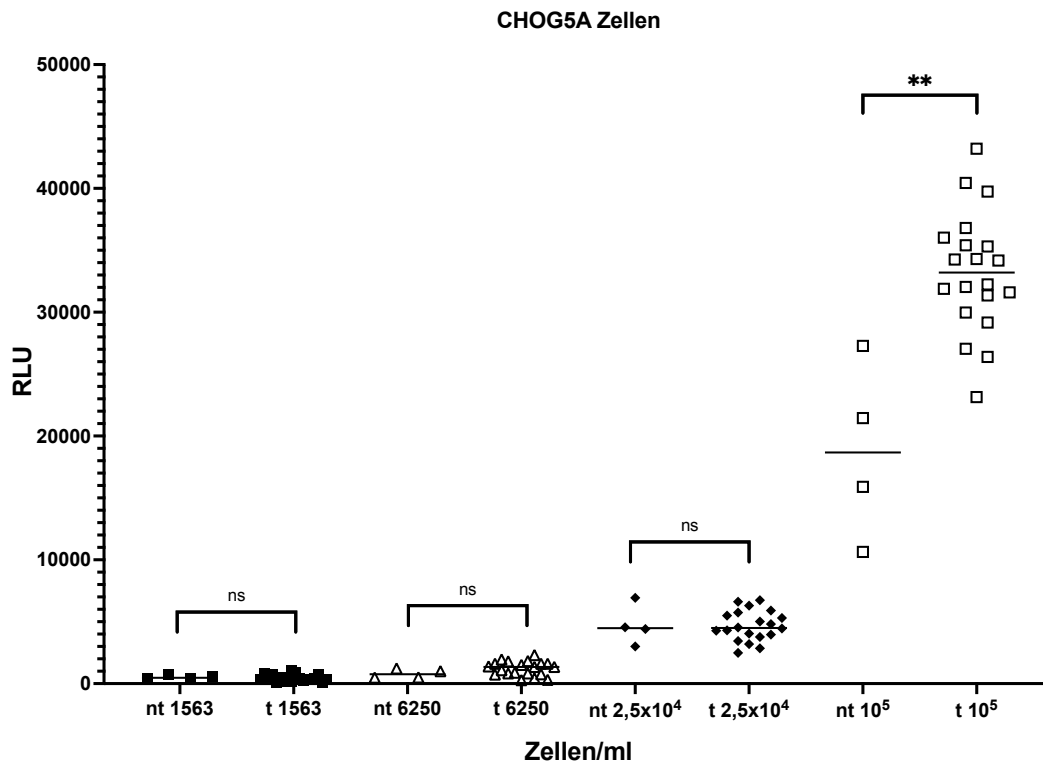


**Abbildung 5: Vergleich der zwei Sensoren des MicroBeta<sup>2</sup> LumiJET**

Sensor 1 misst die Reihen A–D und Sensor 2 die Reihen E–H der 96-Well-Platte. Dargestellt sind die Einzelmessungen und die Mittelwerte (Sensor 1 MW 6397 RLU ± 2160, Sensor 2 MW 6438 RLU ± 2707).

#### **4.2.2 Ermittlung der optimalen CHOG5A-Zellkonzentration pro Well**

Zur Ermittlung der für den Assay optimalen Zellkonzentration wurden CHOG5A-Zellkonzentrationen zwischen 1563 Zellen/ml und  $10^5$  Zellen/ml verwendet (siehe Abbildung 11).



**Abbildung 6: Ermittlung der optimalen Zellkonzentration im AT<sub>1</sub>R Assay mit AT<sub>1</sub>R-transfizierten CHOG5A-Zellen**

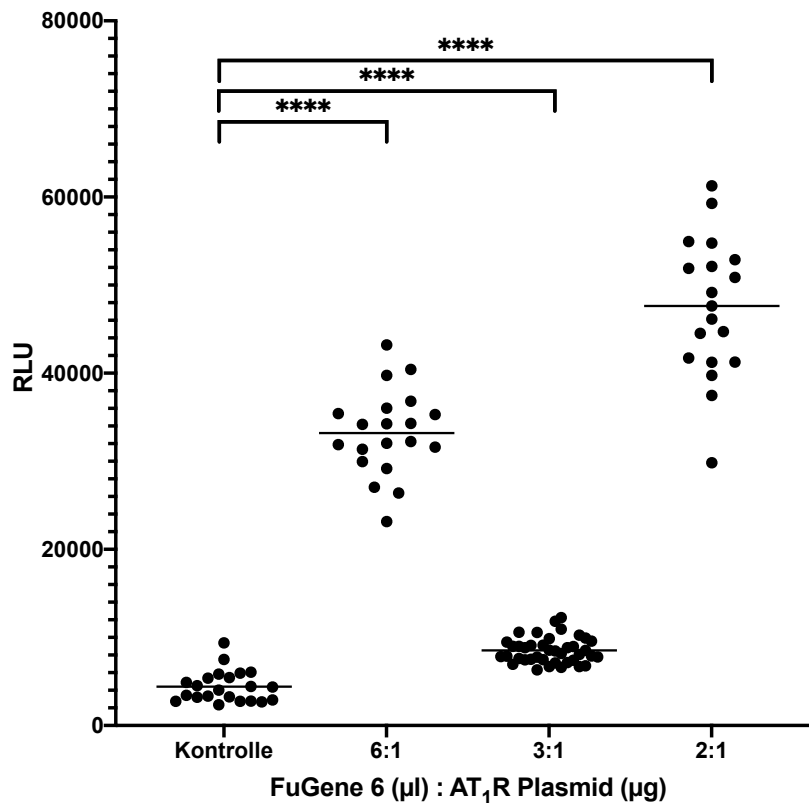
Es wurden Zellkonzentrationen zwischen 1563 Zellen/ml und 10<sup>5</sup> Zellen/ml im Assay verwendet. Jedes Symbol entspricht der RLU eines Wells. Die gemessene RLU der transfizierten (t) Zellen wurde mit denen der nicht transfizierten (nt) verglichen. (p\*\* = 0,0013, ns = nicht signifikant, – = Median).

Eine Zelldichte von 1\*10<sup>5</sup> Zellen/ml (1\*10<sup>4</sup> Zellen/Well) erreichte signifikant höhere RLUs verglichen mit der Kontrolle mit nicht transfizierten CHOG5A-Zellen der gleichen Zelldichte (siehe Abbildung 6). Des Weiteren führte eine Zelldichte von 1\*10<sup>5</sup> Zellen/ml zu einer Konfluenz von ca. 80 bis 90 % im Well, die mit dem Mikroskop optisch bestimmt wurde. Geringere Zellkonzentrationen erzielten niedrige RLUs, wobei sich diese nicht signifikant von den jeweiligen nicht transfizierten Kontrollen unterschieden. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden weitere Versuche mit einer Zellkonzentration von 1\*10<sup>5</sup> Zellen/ml (1\*10<sup>4</sup> Zellen/Well) durchgeführt.

#### **4.2.3 FuGene-6-zu-Plasmid-Verhältnis**

Laut Protokoll des Herstellers des Transfektionsreagenz wird ein Transfektionsansatz-Verhältnis von FuGene 6 zu Plasmid zwischen 6 : 1 und 1,5 : 1 empfohlen. Im vorliegenden Versuch wurden drei FuGene-6-zu-AT<sub>1</sub>R-Plasmid-

Verhältnisse (FuAV) (6 : 1, 3 : 1, 2 : 1) getestet. Die Lumineszenz wurde unter Zugabe von ATII im MicroBeta<sup>2</sup> LumiJET gemessen. Als Kontrolle der Transfektion (n = 22) dienten nicht transfizierte CHO5A-Zellen (siehe Abbildung 7).



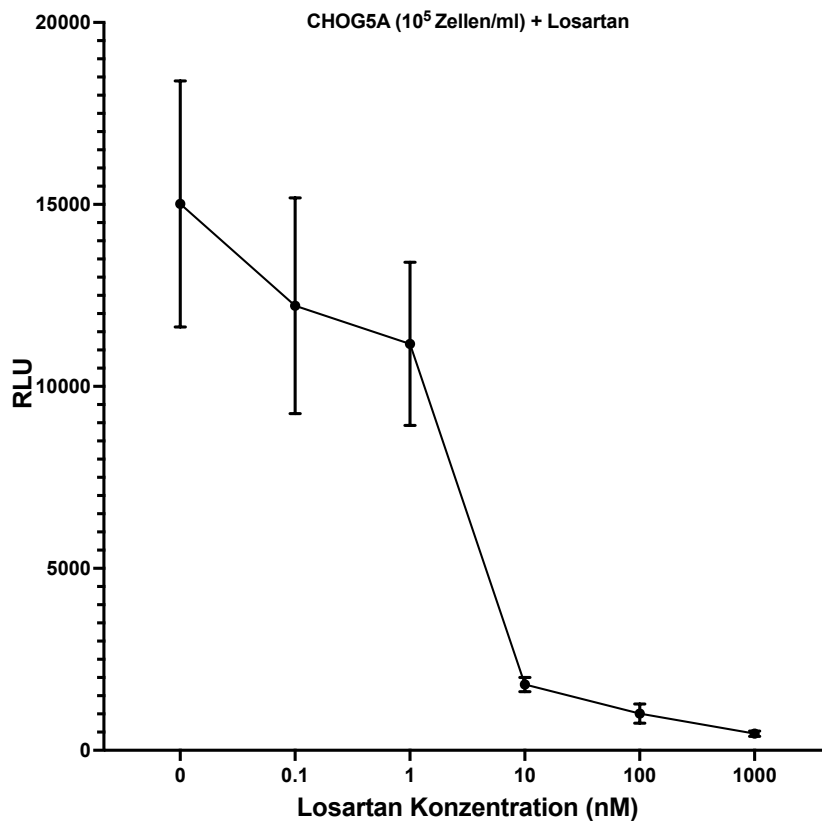
**Abbildung 7: Ermittlung des FuGene-6-zu-AT<sub>1</sub>R-Plasmid-Verhältnisses**

Jedes Symbol entspricht den gemessenen RLUs eines Wells. Die RLUs aller FuAV unterschieden sich signifikant von den RLUs der Kontrollen ( $p^{****} < 0,0001$ ; – = Median).

Die RLUs der FuAV unterschieden sich signifikant von der RLU der Kontrollen (Kontrolle zu 6 : 1, 2 : 1  $p < 0,0001$ , Kontrolle zu 3 : 1  $p < 0,0009$ ), weswegen von einer erfolgreichen Transfektion auszugehen ist. Mit einem FuAV von 2 : 1 wurden die höchsten RLU-Werte erzielt. Die weiteren Versuche wurden daher mit einem FuAV von 2 : 1 durchgeführt [175].

#### **4.2.4 Validierung des Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptors auf transfizierten CHO5A-Zellen mittels Losartan**

Zur Validierung des AT<sub>1</sub>R wurde Losartan in Endkonzentrationen zwischen 0 µM und 100 µM eine Stunde vor der Zugabe von ATII zu den AT<sub>1</sub>R-transfizierten CHO5A-Zellen hinzugegeben (siehe Abbildung 8).



**Abbildung 8: Hemmung von AT<sub>1</sub>R-transfizierten CHO5A-Zellen mittels Losartan**

Zur Validierung des AT<sub>1</sub>R-Assays mit AT<sub>1</sub>R-transfizierten CHO5A-Zellen wurde Losartan (Endkonzentration: 0–100 µM) eine Stunde vor Zugabe von ATII hinzugefügt. Der Assay wurde nach Protokoll durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.4). Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind angegeben.

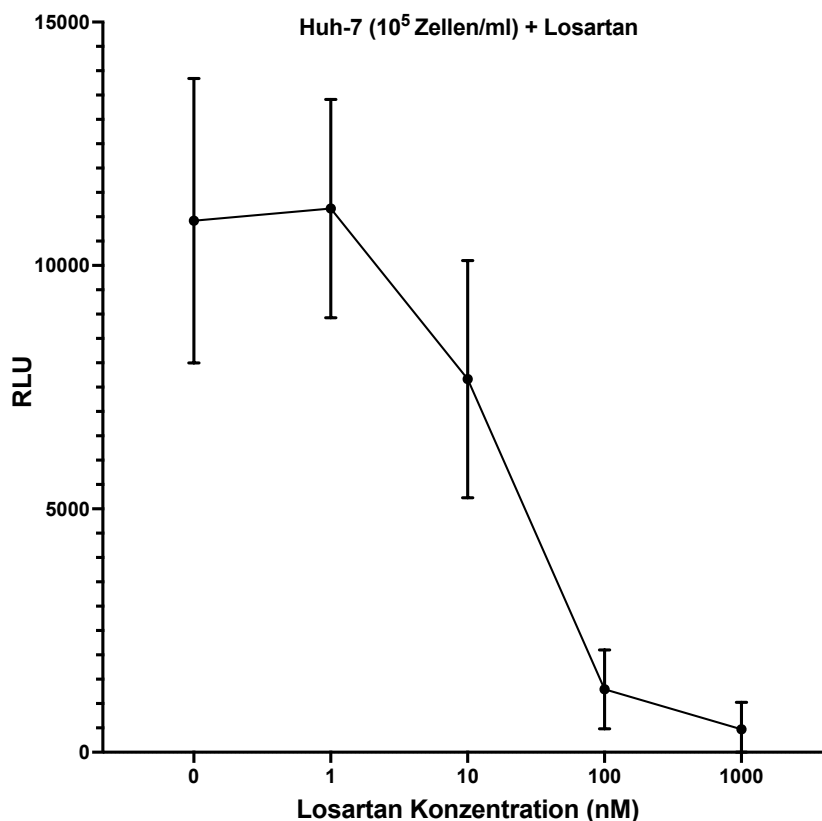
Bereits eine Losartan-Konzentration von 0,1 nM induzierte eine Hemmung der Calciumfreisetzung. Weitere Konzentrationssteigerungen führten zu einer vermehrten Hemmung. Durch den selektiven kompetitiven Antagonisten Losartan konnte eine Hemmung der ATII-induzierten Wirkung auf den AT<sub>1</sub>R der CHO5A-Zellen erzielt werden. Diese Ergebnisse wurden bereits im Journal *Frontiers in Immunology* veröffentlicht [175].

### 4.3 AT<sub>1</sub>R-Assay mit GFP-transfizierten Huh-7-Zellen

Nachdem im Odyssey-Westernblot (siehe Kap. 4.1.1) und In-Zell-Westernblot (siehe Kap. 4.1.2) der AT<sub>1</sub>R auf der Plasmamembran der Huh-7-Zellen nachgewiesen worden waren und die Ergebnisse der Assays ähnliche Ergebnisse geliefert hatten, wurde für die weiteren Experimente die Zelllinie Huh-7 gewählt, da es sich bei dieser um eine humane Zelllinie handelt.

#### 4.3.1 Validierung des AT<sub>1</sub>R auf der Plasmamembran GFP/Aequorin-transfizierter Huh-7-Zellen mittels Losartan

Ab einer Losartan-Konzentration von 10 nM wurde die Calciumfreisetzung deutlich gehemmt. Die weitere Steigerung der Losartan-Konzentration reduzierte die RLU auf 12 % (100 nM) bzw. 4 % (1 µM) ihres Ausgangswertes (siehe Abbildung 9) [175].



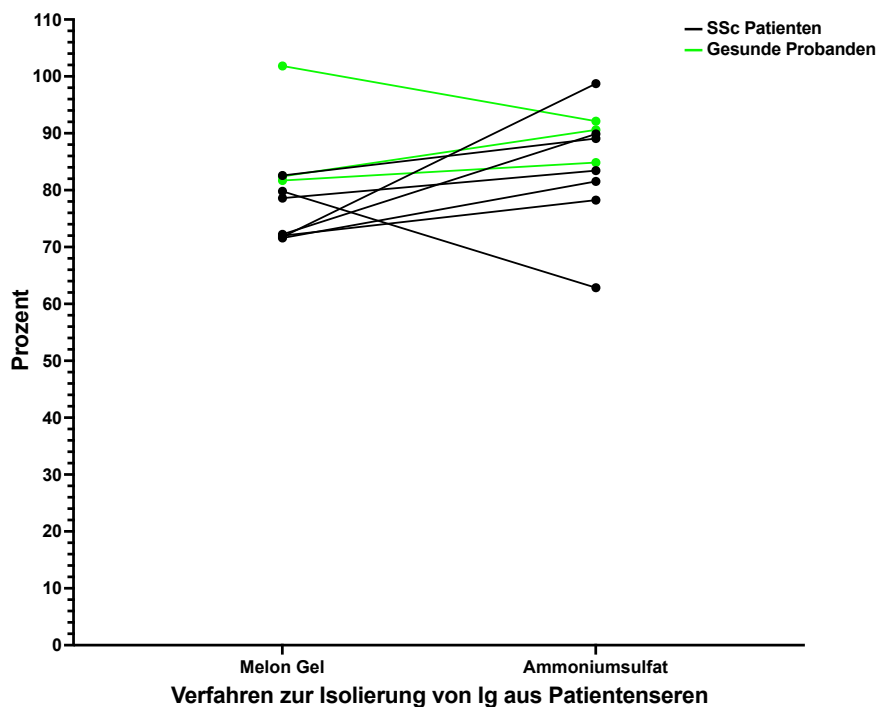
**Abbildung 9: Validierung des Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptors auf Huh-7-Zellen mittels Losartan**  
Dargestellt sind die Mittelwerte aus Achtfach-Bestimmungen und die Standardabweichung. Als Vergleichswert dienen Huh-7-Zellen, die nicht mit Losartan inkubiert wurden.

#### 4.3.2 Vergleich von Melon-Gel- und Ammoniumsulfat-gefällten Seren im AT<sub>1</sub>R-Assay mit Huh-7-Zellen

Exemplarisch wurden Seren von gesunden Probanden (n = 4) und SSc-Patienten (n = 7) jeweils mit Melon Gel (MG) und Ammoniumsulfat (siehe Kap. 3.3.2) gefällt. Die isolierten Ig wurden anschließend im AT<sub>1</sub>R-Assay mit Huh-7-Zellen (siehe Kap. 3.3.4.4) getestet. Dabei wurde untersucht, welches Verfahren der Ig-

Isolierung sich besser für die Durchführung des Assays eignet. Um mögliche Messfehler auszugleichen, wurde jedes Serum vierfach bestimmt.

Für die Darstellung in Abbildung 10 wurden die gemessene RLU der transfizierten Huh-7-Zellen, die nicht Ig ausgesetzt wurden als 100 % definiert. Anteilig daran wurden die Mittelwerte der RLU der Vierfach-Bestimmung der mit MG und AS gefällten Seren berechnet. Die MG-gefällte Seren erzielten Werte im Bereich zwischen 72 % und 102 %, AS-gefällte Seren Werte im Bereich zwischen 63 % und 99 %.



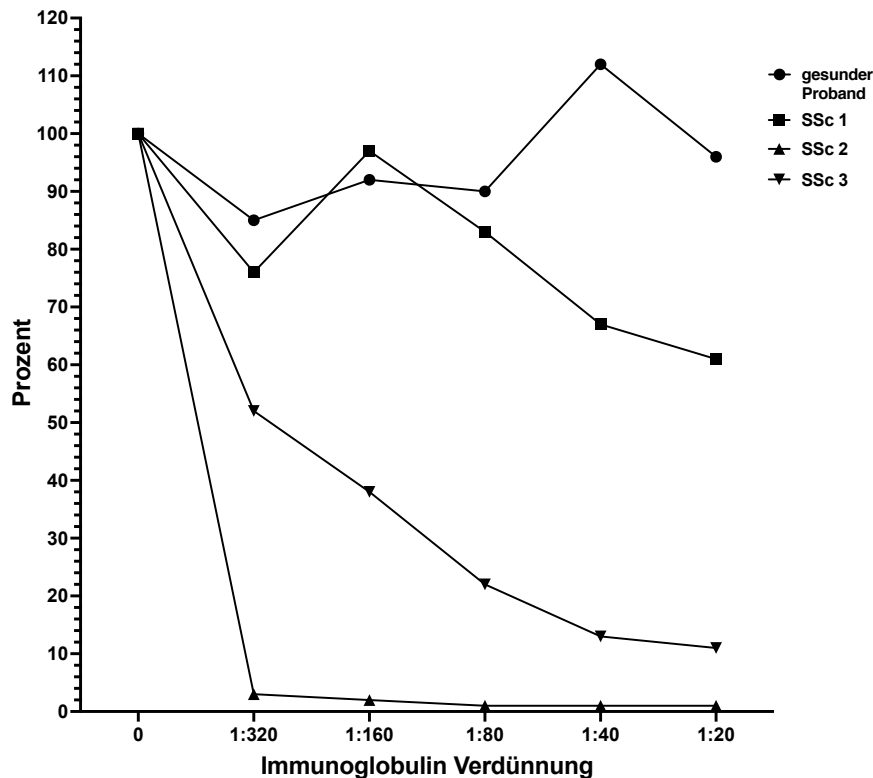
**Abbildung 10: Vergleich der Ammoniumsulfat- und Melon-Gel-gefällten Seren im AT<sub>1</sub>R-Assay**

Dargestellt sind die Mittelwerte aus je vier Einzelmessungen (Messwert ohne Ig-Zugabe = 100 %). Getestet wurden mit Melon Gel oder Ammoniumsulfat isolierte Igs von gesunden Probanden (grün, n = 3) und SSc-Patienten (schwarz, n = 7).

Beide Verfahren lieferten vergleichbare Ergebnisse. Da die Isolierung von Antikörpern aus Seren mittels AS kostengünstiger und weniger zeitintensiv ist, wurden die weiteren Versuche mit AS-gefällten Seren durchgeführt.

### 4.3.3 Optimierung der Immunglobulin-Konzentration im AT<sub>1</sub>R-Assay mit Huh-7-Zellen

Zur Ermittlung der optimalen Konzentration für die Diskriminierung inhibierender und stimulierender Immunglobuline wurden Verdünnungsreihen von AS-gefällten Seren in Endverdünnungen von 1 : 320, 1 : 160, 1 : 80, 1 : 40 und 1 : 20 getestet (siehe Abbildung 11).



**Abbildung 11: Ermittlung der optimalen Immunglobulin-Konzentration im AT<sub>1</sub>R-Assay**

Der Mittelwert der Zweifach-Bestimmung wurde in ein Verhältnis zu den transfizierten Huh-7-Zellen ohne Zugabe von Ig (hier als 0 abgebildet) gesetzt und in Prozent angegeben. Es wurden Ig-Verdünnungsreihen (1 : 320, 1 : 160, 1 : 80, 1 : 40, 1 : 20) aus Seren von gesunden Probanden (n = 1) und SSc-Patienten (n = 3) getestet.

Die Zugabe von im Verhältnis von 1 : 40 verdünnten Immunglobulin von drei SSc-Patienten führte zu einer deutlichen Hemmung der Calciumfreisetzung. Ig von gesunden Probanden induzierte, unabhängig von der Konzentration, keine Veränderung der Calciumfreisetzung. In den nachfolgenden Experimenten wurde eine Ig-Verdünnung von 1 : 40 verwendet.

#### **4.3.4 Proteinbestimmung nach Bradford**

Die AS-gefällten Proben von zwei SSc-Patienten und einem gesunden Probanden wurden auf ihren Proteingehalt untersucht (siehe Tabelle 8).

**Tabelle 8: Proteinbestimmung nach Bradford**

Exemplarisch wurde der Proteingehalt von drei AS-gefällten Seren (zwei SSc-Patienten und ein gesunder Proband) ermittelt und der Mittelwert (MW) gebildet.

<b>Probe</b>	<b>Proteingehalt</b>
SSc 1	14,2 mg/ml
SSc 2	12,8 mg/ml
gesunder Proband	11,5 mg/ml
<b>MW</b>	<b>12,8 mg/ml</b>

Es wurde ein Durchschnittsproteingehalt von 12,8 mg/ml ermittelt. Da die Proben im Verhältnis 1 : 40 verdünnt worden waren (siehe Kap. 4.3.3), wurde im AT<sub>1</sub>R- und im Luciferase-Assay eine durchschnittliche Proteinkonzentration von 0,32 mg/ml verwendet.

#### **4.4 AT<sub>1</sub>R-Assay**

Im Folgenden sind die Ergebnisse aufgeführt, die mit dem AT<sub>1</sub>R-Assay (siehe Kap. 3.3.4) erzielt wurden [175].

##### **4.4.1 Nachweis funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper in Patienten mit verschiedenen Erkrankungen**

Mithilfe des funktionellen AT<sub>1</sub>R-Assays wurden Ig von 73 SSc-Patienten auf stimulierende und inhibierende Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper untersucht. 38 (52 %) dieser hatten funktionell aktive Antikörper gegen den AT<sub>1</sub>R, wobei bei 25 (34 %) eine stimulierende und bei 13 (18 %) eine inhibitorische Wirkung vorlag (siehe Tabelle 9). Ähnliche Zahlen wurden bei Patienten mit SS, MCTD oder PM beobachtet; die Prävalenz der stimulierenden Antikörper war bei Patienten mit SLE und RA signifikant niedriger als bei SSc-Patienten.

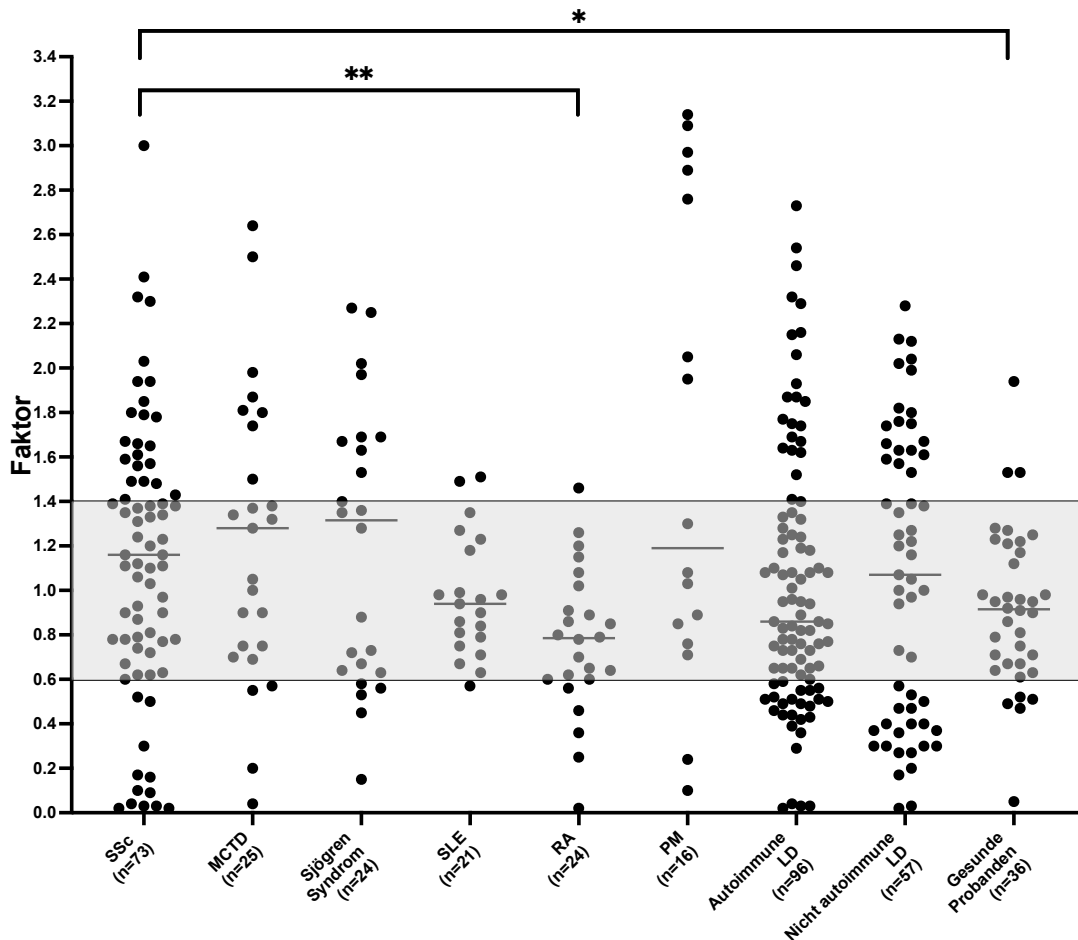


**Tabelle 9: Prävalenz von stimulierenden und inhibierenden Antikörpern gegen den AT<sub>1</sub>R in Immunglobulinen von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen**

Diagnose	Anzahl getestet	Antikörper gegen den AT <sub>1</sub> R		
		inhibierend	stimulie- rend	gesamt
		Anzahl (%) positive		
SSc	73	13 (18)	25 (34)	38 (52)
<i>mixed connective tissue disease</i> (MCTD)	25	4 (16)	9 (36)	13 (52)
Sjögren-Syndrom (SS)	24	5 (21)	9 (38)	13 (59)
Systemischer Lupus erythematodes (SLE)	21	1 (5)	2 (10) <sup>*)</sup>	3 (15) <sup>*)</sup>
rheumatoide Arthritis (RA)	24	6 (25)	1 (4) <sup>*)</sup>	7 (29)
Polymyalgia rheumatica (PM)	16	2 (13)	7 (44)	9 (57)
autoimmune Lebererkrankungen (PBC, PSC, AIH)	97	25 (26)	22 (23)	47 (49)
nicht autoimmune Lebererkrankungen (toxisch, viral)	57	21 (37) <sup>*)</sup>	19 (33)	40 (70) <sup>*)</sup>
gesunde Probanden (GP)	36	5 (14)	3 (8) <sup>*)</sup>	8 (22) <sup>*)</sup>

signifikant im Vergleich zu SSc-Patienten; <sup>\*)</sup>p < 0,05

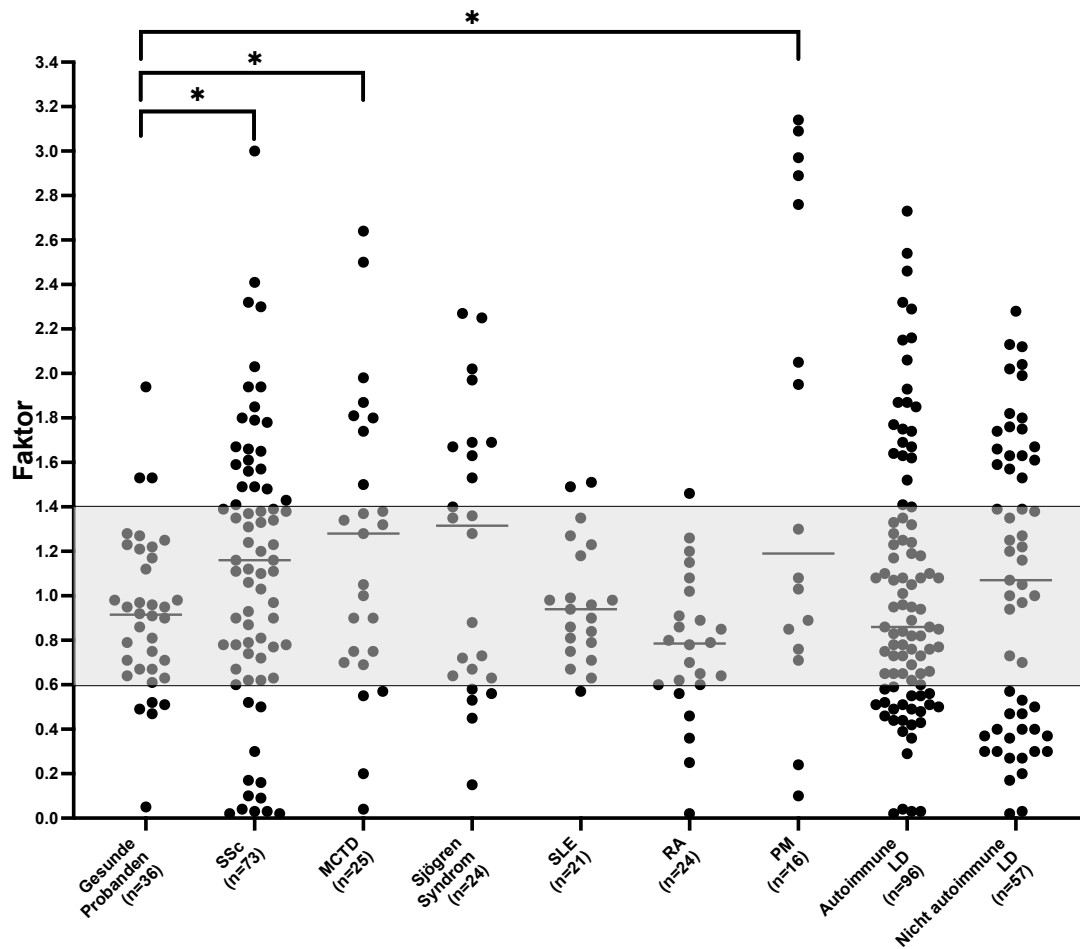
Interessanterweise wurden Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper auch bei 49 % der Patienten mit autoimmunen Lebererkrankungen (23 % stimulierend, 26 % inhibierend) und sogar bei 70 % der Patienten mit viraler oder toxischer Hepatitis (33 % stimulierend, 37 % hemmend) nachgewiesen. Insbesondere bei Patienten mit nicht autoimmunen Lebererkrankungen waren inhibierende Antikörper häufiger zu finden als bei SSc-Patienten und gesunden Probanden (37 % versus 18 % bzw. 14 %).



**Abbildung 12: Aktivität von Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern in Seren von SSc-Patienten gegenüber Patienten mit anderen Erkrankungen und gesunden Probanden gemessen im AT<sub>1</sub>R-Assay**

Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils vier Einzelmessungen. Der graue Bereich zeigt den Normalbereich an (ns = nicht signifikant; \*p < 0,05; \*\*p < 0,01 versus SSc; - = Median).

Abbildung 12 ist zu entnehmen, dass die Reaktivitäten der funktionellen Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper in den Patientengruppen mit rheumatoider Arthritis (p = 0,0037) und bei gesunden Probanden (p = 0,0439) signifikant geringer waren als bei Patienten mit SSc.



**Abbildung 13: Aktivität von Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern in Seren von gesunden Probanden gegenüber Patienten mit anderen Erkrankungen gemessen im AT<sub>1</sub>R-Assay**

Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils vier Einzelmessungen. Der graue Bereich zeigt den Normalbereich an (ns = nicht signifikant; \*p < 0,05 versus gesunde Probanden; - = Median).

Patienten mit SSC, MCTD und PM weisen eine signifikant höhere Reaktivität von funktionell aktiven Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern auf, verglichen mit gesunden Probanden (p < 0,05) (siehe Abbildung 13).

Tabelle 10: *Receiver-Operating-Characteristics*-Analyse der funktionell aktiven Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen verglichen mit denen gesunder Probanden

Diagnose	Anzahl getesteter Patienten	AUC	p
SSc	73	0,63	<b>0,03<sup>*)</sup></b>
<i>mixed connective tissue disease</i> (MCTD)	25	0,68	<b>0,02<sup>*)</sup></b>
Sjögren-Syndrom (SS)	24	0,51	0,88
Systemischer Lupus erythematodes (SLE)	21	0,55	0,49
rheumatoide Arthritis (RA)	24	0,63	0,09
Polymyalgia rheumatica (PM)	16	0,68	<b>0,04<sup>*)</sup></b>
autoimmune Lebererkrankungen (PBC, PSC, AIH)	97	0,51	0,83
nicht autoimmune Lebererkrankungen (toxisch, viral)	57	0,56	0,37

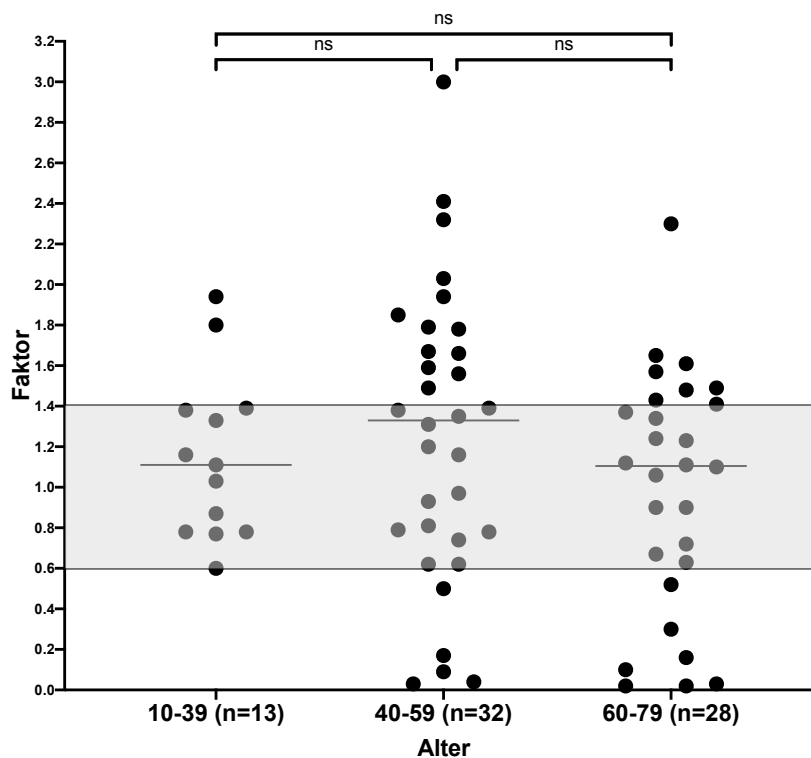
signifikant im Vergleich mit gesunden Probanden; <sup>\*)</sup>p < 0,05; AUC = *Area under the Curve*

Es wurde eine *Receiver-Operating-Characteristics*-Analyse der Reaktivität von funktionell aktiven Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen verglichen mit denen gesunder Probanden durchgeführt (siehe Tabelle 10). Die Reaktivität der Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper von Patienten mit SSc (AUC = 0,63, \*p = 0,03), mit MCTD (AUC = 0,68, \*p = 0,02) und mit PM (AUC = 0,68, \*p = 0,04) unterscheidet sich signifikant von der gesunder Probanden.

#### 4.4.2 Prävalenz funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper bei Patienten mit SSc

Die Ergebnisse des Calcium-Assays wurden in Abhängigkeit von verschiedenen Eigenschaften der SSc-Patienten (Alter, Geschlecht und Form der SSc) dargestellt.

a) Alter



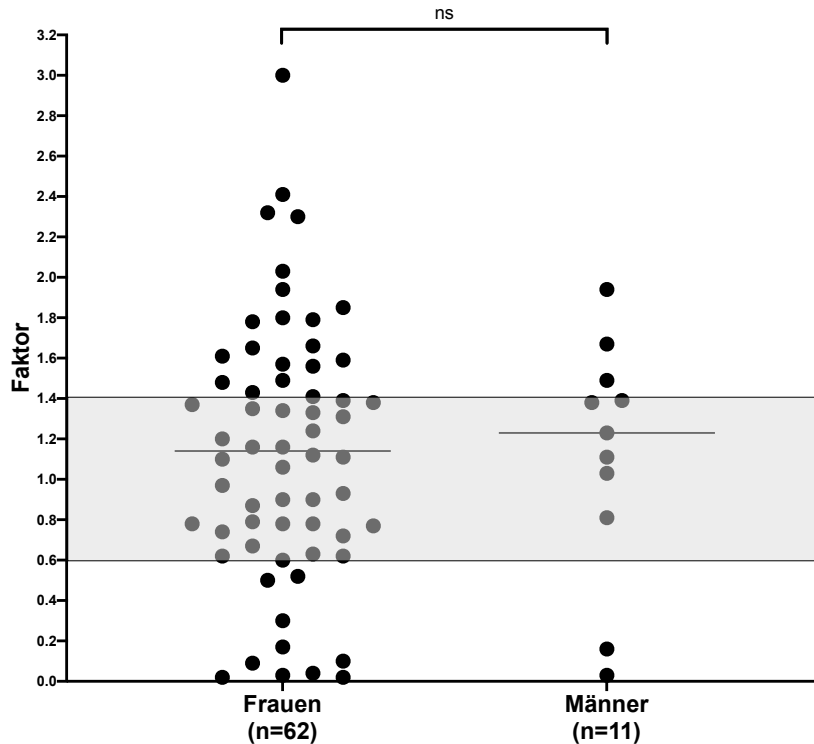
**Abbildung 14: Reaktivität funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper in Seren von SSc-Patienten unterschiedlicher Altersklassen**

Abgebildet wurde der Reaktivitätsfaktor, der in Bezug auf gesunde Probanden bestimmt wurde. Insgesamt wurden  $n = 73$  SSc-Patienten analysiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-u-Test. Dieser zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Prävalenz funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper in den verschiedenen Altersklassen (10–39, 40–59, 60–79). Der graue Bereich definiert den Normbereich (ns = nicht signifikant; - = Median).

Die Patienten in den drei Altersklassen unterschieden sich nicht signifikant voneinander (siehe Abbildung 14).

b) Geschlecht

Im weiteren Verlauf wurde die Reaktivität der funktionellen Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper in Abhängigkeit vom Geschlecht analysiert. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Männern und Frauen (siehe Abbildung 15).

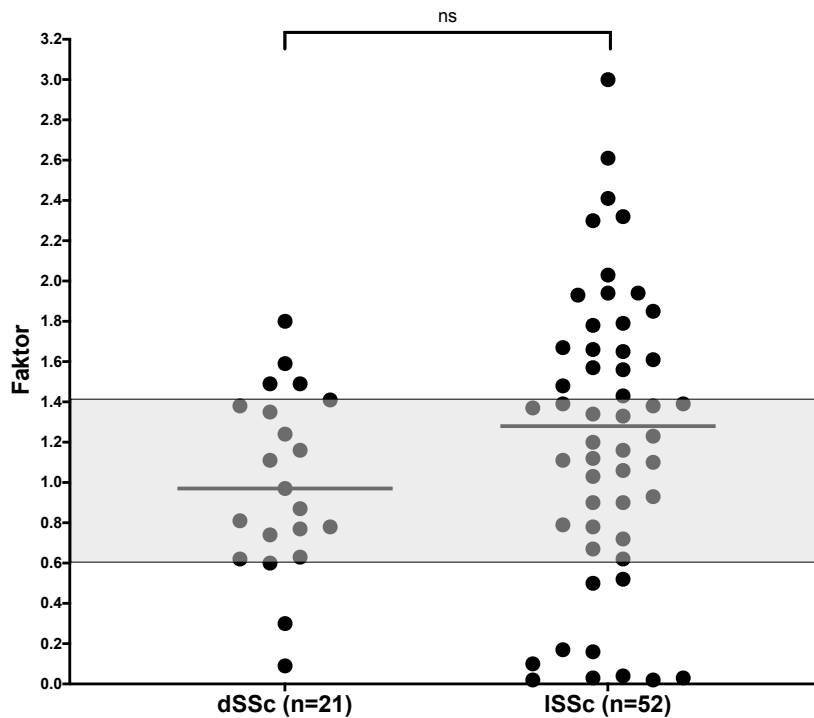


**Abbildung 15: Reaktivität von Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern bei männlichen (n = 11) und weiblichen (n = 62) SSc-Patienten**

Dargestellt ist der Reaktivitätsfaktor jedes Patienten. Die statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-u-Test ergab keine signifikanten Unterschiede in der Prävalenz von reaktiven Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern und dem Geschlecht (ns = nicht signifikant; - = Median).

### c) Unterform der SSc

Das Patientenkollektiv der unter SSc leidenden Patienten (n = 73) wurde anhand von klinischen Symptomen und Antikörperprofilen gemäß internationalen Kriterien der limitierten (n = 52) und diffusen (n = 21) Unterform der SSc zugeordnet. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der limitierten und der diffusen Unterform der SSc in Bezug auf den Reaktivitätsfaktor der Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper festgestellt werden (siehe Abbildung 16).

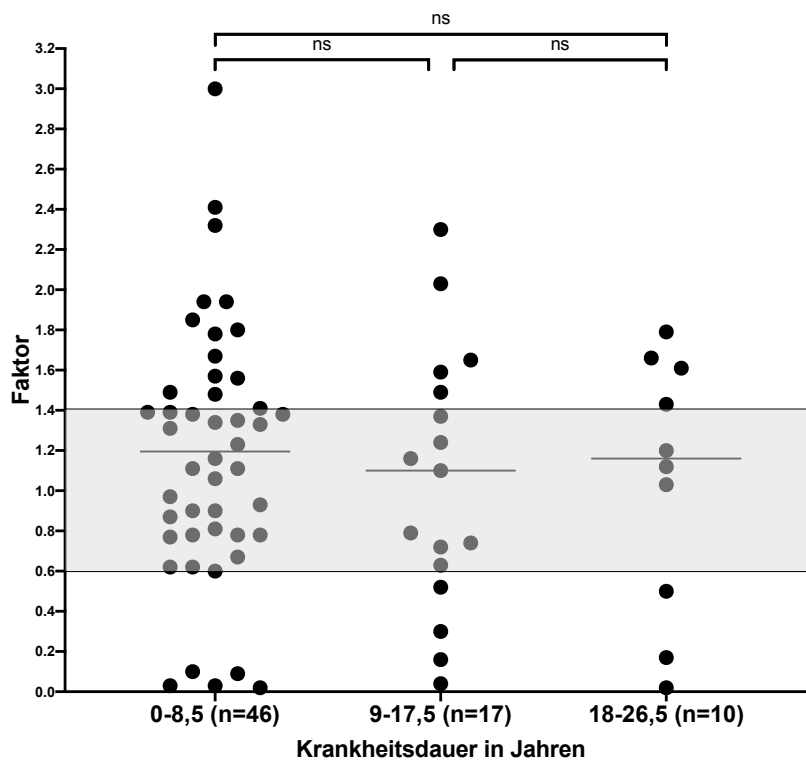


**Abbildung 16: Reaktivität funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper bei der limitierten und der diffusen Form der SSc**

Die Seren von SSc-Patienten wurden nach internationalen Kriterien in Bezug auf die limitierte (n = 52) und die diffuse (n = 21) Form der SSc differenziert. Die statistische Auswertung mit dem Mann-Whitney-u-Test ergab keine signifikanten Unterschiede in der Prävalenz reaktiver Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper und der SSc-Unterformen.

#### d) Dauer der Erkrankung

Im weiteren Verlauf wurde die Krankheitsdauer der SSc-Patienten bestimmt, und die Patienten wurden anhand dieser Dauer in drei Gruppen eingeteilt. Der Großteil der Patienten (n = 46) litt zwischen 0 und 8,5 Jahren an SSc. 17 Patienten waren zwischen 9 und 17,5 Jahre lang betroffen, 10 Patienten zwischen 18 und 26,5 Jahre lang.



**Abbildung 17: Analyse des Zusammenhangs zwischen der Reaktivität von Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern und der Krankheitsdauer bei Patienten mit SSc**

Die SSc-Patientenseren wurden in drei Gruppen je nach Krankheitsdauer eingeteilt. Die statistische Auswertung mit dem Mann-Whitney-u-Test ergab keine signifikanten Unterschiede in der Prävalenz reaktiver Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper und der Krankheitsdauer. Der graue Bereich beschreibt den Normbereich (ns = nicht signifikant; - = Median).

Die Krankheitsdauer wurde in Bezug auf die Reaktivität der Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper analysiert. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede in der Prävalenz und Reaktivität der funktionellen Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper und der Krankheitsdauer ermittelt werden (siehe Abbildung 17).

#### ***4.4.3 Prävalenz funktioneller stimulierender und inhibierender Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper in Patienten mit SSc in Relation zu verschiedenen Organmanifestationen***

Die SSc kann sich an einer Vielzahl von Organen manifestieren, was als diagnostisches Kriterium dient. Im Folgenden wurde die Prävalenz funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper bei SSc-assoziierten Organmanifestationen betrachtet (siehe Tabelle 11).



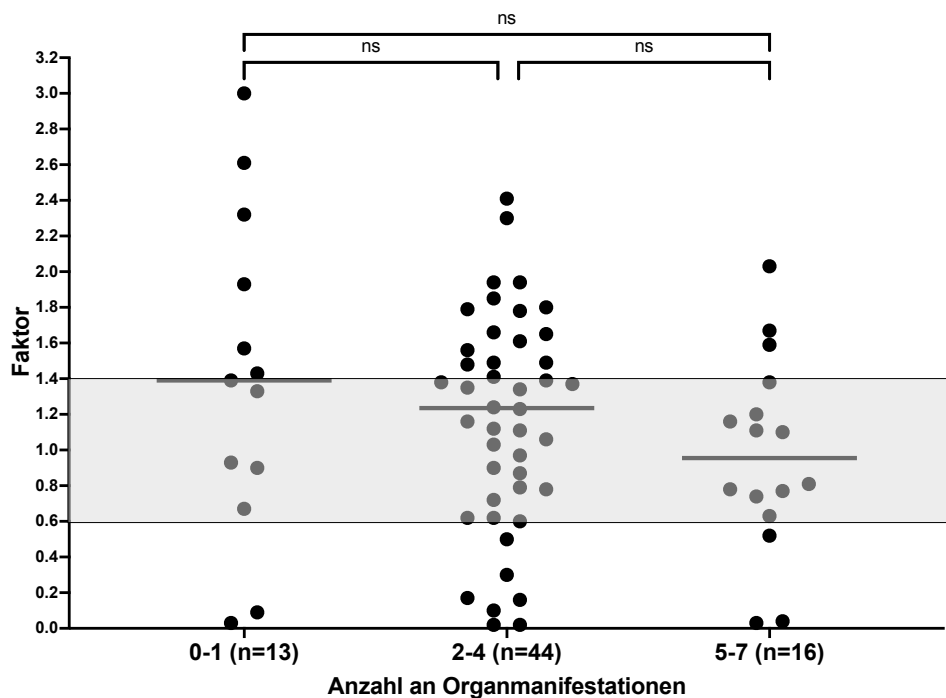
**Tabelle 11: Prävalenz von stimulierenden und inhibierenden Antikörpern gegen den AT<sub>1</sub>R in Patienten mit SSc und verschiedenen Organmanifestationen**

klinische Symptome		Anzahl getestet	Antikörper gegen den AT <sub>1</sub> R		
			gesamt	inhibierend	stimulierend
			Anzahl (%) positive		
dcSSc		21	8 (38)	3 (14)	5 (24)
lcSSc		52	30 (57)	10 (19)	20 (38)
Organmani- festation	0–1	13	8 (62)	2 (17)	6 (46)
	2–4	44	24 (54)	8 (18)	16 (36)
	5–7	16	6 (38)	3 (19)	3 (19)
Hautmanifes- tation	ohne	11	7 (43)	2 (18)	5 (45)
	mit	62	31 (31)	11 (18)	20 (32)
Calcinosis	ohne	57	34 (59)	11 (19)	23 (40)
	mit	6	4 (66)	2 (33)	2 (33)
digitale Ulcera	ohne	44	23 (52)	6 (14)	17 (39)
	mit	29	14 (48)	6 (21)	8 (28)
Lungenmani- festation	ohne	33	20 (60)	7 (21)	13 (39)
	mit	40	17 (43)	5 (13)	12 (30)
PAH	ohne	59	30 (50)	10 (17)	20 (34)
	mit	14	7 (50)	2 (14)	5 (36)
Herzmanifes- tation	ohne	64	34 (53)	12 (19)	22 (34)
	mit	9	3 (33)	0	3 (33)
Sicca-Syn- drom	ohne	59	28 (48)	8 (14)	20 (34)
	mit	14	9 (64)	4 (29)	5 (36)

Myositis	ohne	65	35 (54)	10 (15)	25 (38)
	mit	8	2 (25)	2 (25)	0 <sup>*)</sup>
ösophageale Manifestation	ohne	44	23 (52)	6 (14)	17 (39)
	mit	29	14 (49)	6 (21)	8 (28)

\*) Signifikanz im Vergleich zu Patienten ohne Myositis ( $p < 0,05$ )

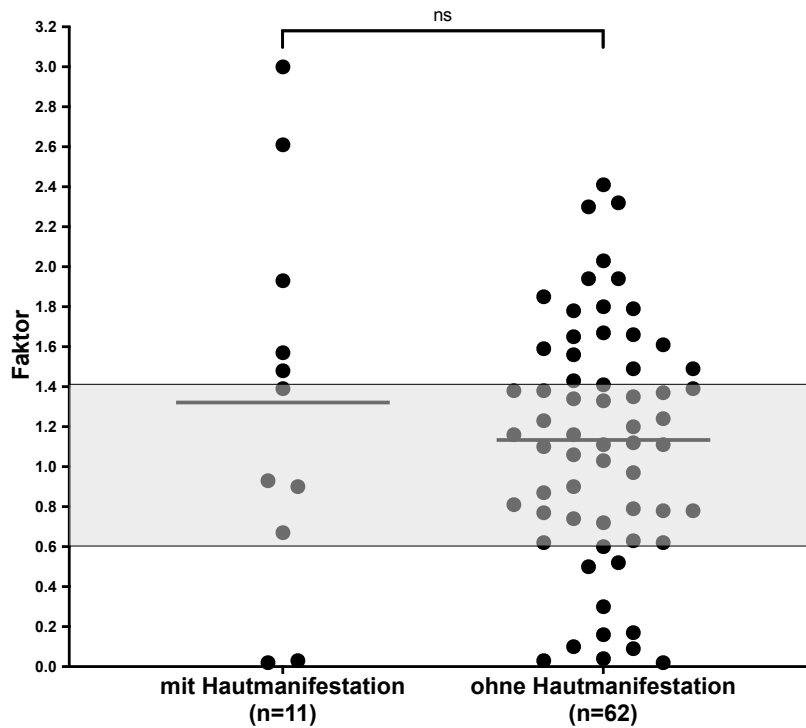
Die Seren von SSc-Patienten wurden in Abhängigkeit von der Anzahl an Organmanifestationen in drei Gruppen (0–1, 2–4, 5–7) eingeteilt. Der Großteil ( $n = 44$ ) der 73 SSc-Patienten litt an zwei bis vier Organmanifestationen. Maximal eine Organmanifestation wiesen 13 Patienten auf, fünf bis sieben Organmanifestationen 16 Patienten. Die Analyse der Unterschiede in der Reaktivität und Prävalenz der funktionellen Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper im Zusammenhang mit der Anzahl der Organmanifestationen ergab kein signifikantes Ergebnis (siehe Tabelle 11, Abbildung 18).



**Abbildung 18: Reaktivität von Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern bei 73 SSc-Patienten in Relation zur Anzahl an Organmanifestationen**

Die statistische Auswertung mit dem Mann-Whitney-u-Test ergab keine signifikanten Unterschiede in der Prävalenz reaktiver Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper und der Anzahl an Organmanifestationen. Der graue Bereich beschreibt den Normbereich (ns = nicht signifikant; - = Median).

Im Weiteren wurde die Reaktivität funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper in Patienten mit SSc-typischen Organmanifestationen bestimmt und mit der von SSc-Patienten verglichen, die keine solchen Organmanifestationen aufweisen.



**Abbildung 19: Reaktivität funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper bei SSc-Patienten mit und ohne Hautmanifestationen**  
(ns = nicht signifikant; - = Median)

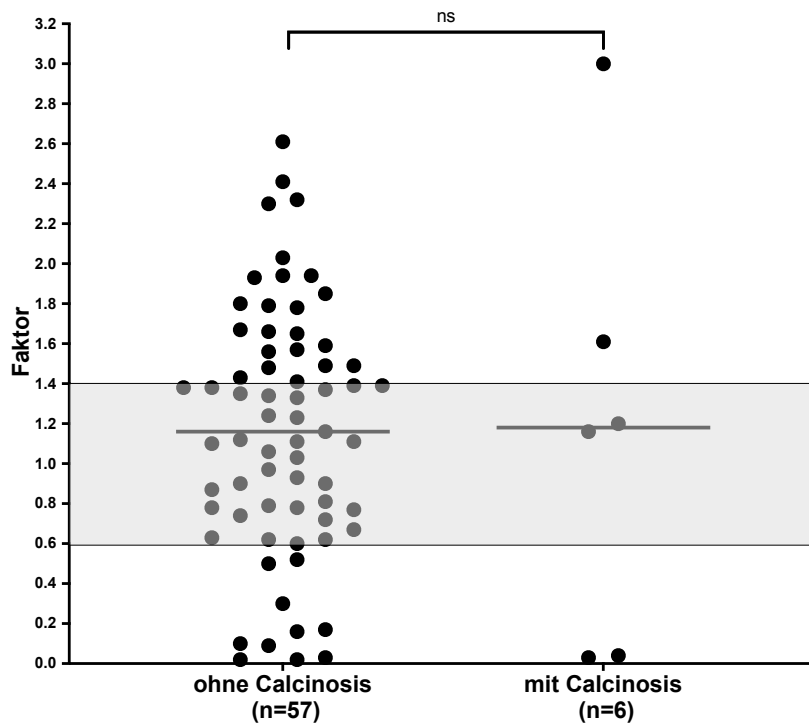


Abbildung 20: Reaktivität funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper bei SSc-Patienten mit und ohne Calcinosis

(ns = nicht signifikant; - = Median)

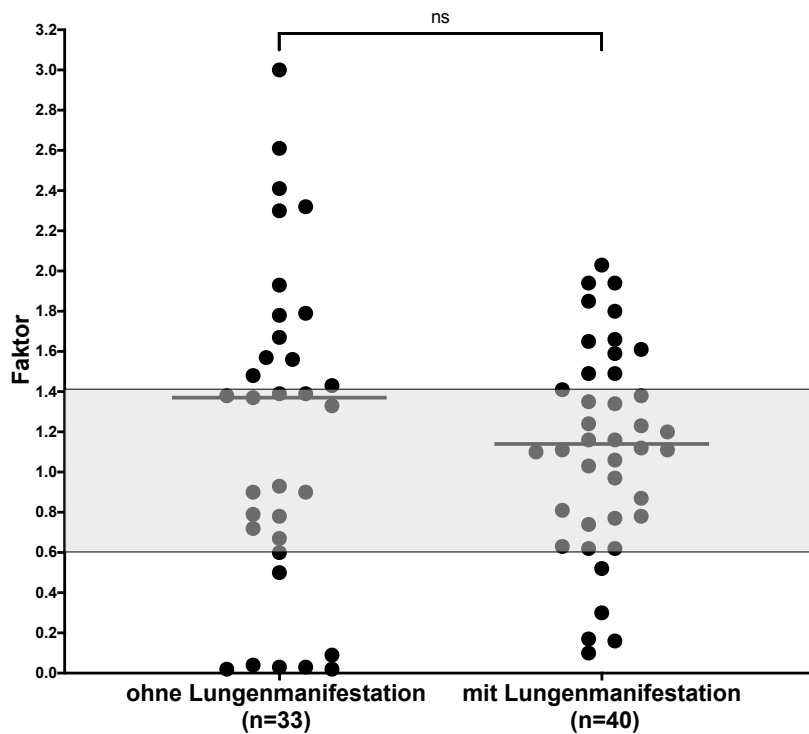
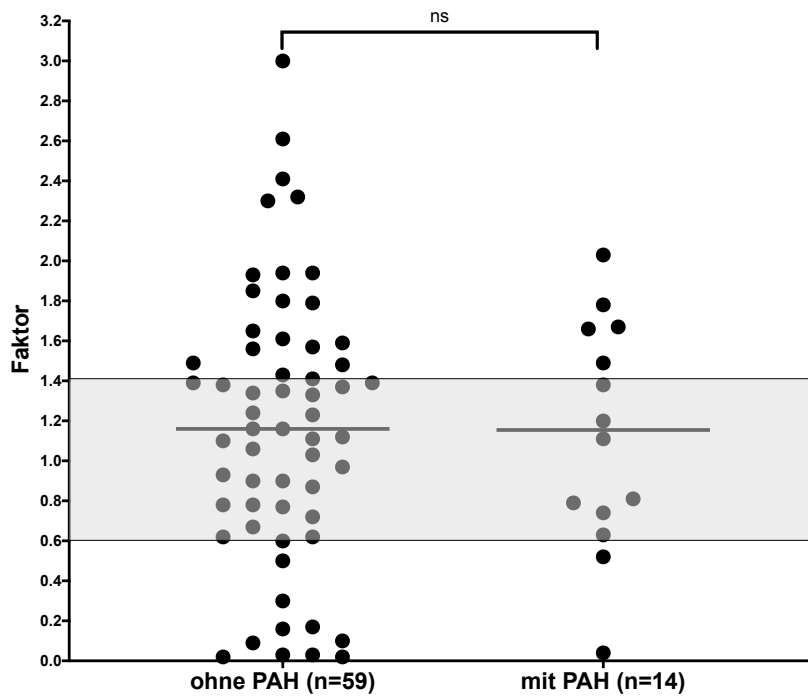
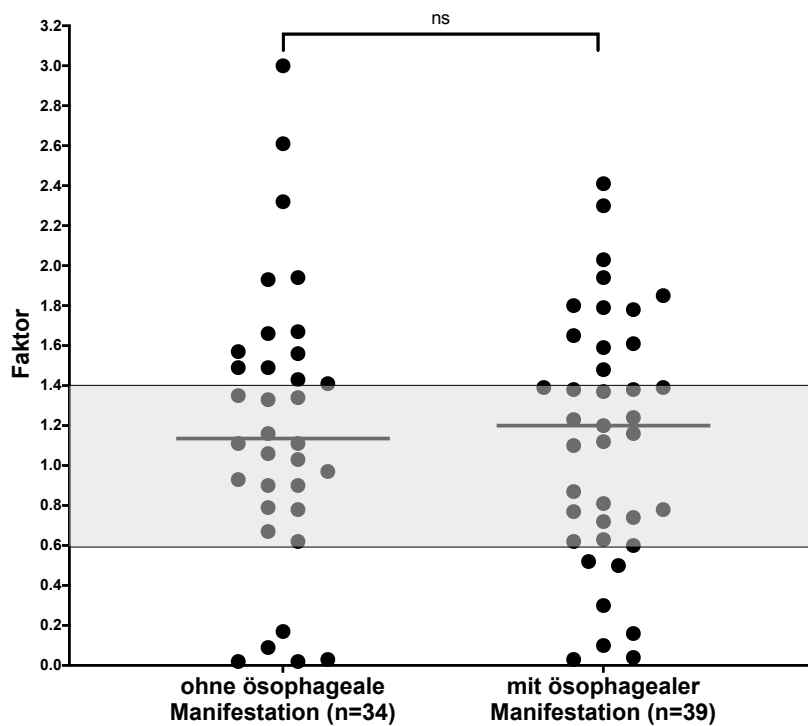


Abbildung 21: Reaktivität funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper bei SSc-Patienten mit und ohne Lungenmanifestation

(ns = nicht signifikant; - = Median)



**Abbildung 22: Reaktivität funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper bei SSc-Patienten mit und ohne pulmonal-arterielle Hypertonie**  
 (PAH = pulmonal-arterielle Hypertonie; ns = nicht signifikant; - = Median)



**Abbildung 23: Reaktivität funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper bei SSc-Patienten mit und ohne ösophageale Manifestation**  
 (ns = nicht signifikant; - = Median)

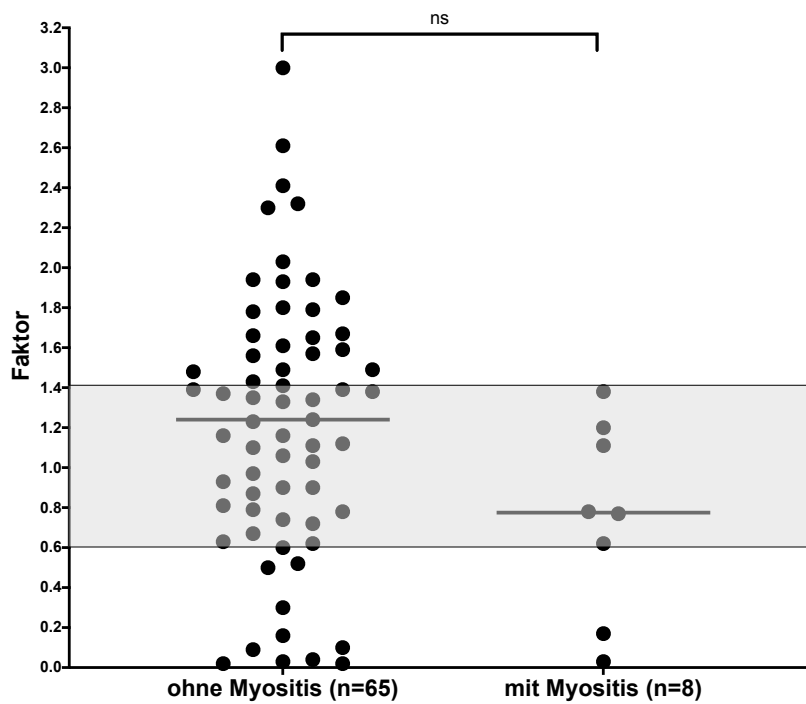


Abbildung 24: Reaktivität funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper bei SSc-Patienten mit und ohne Myositis

(ns = nicht signifikant; - = Median)

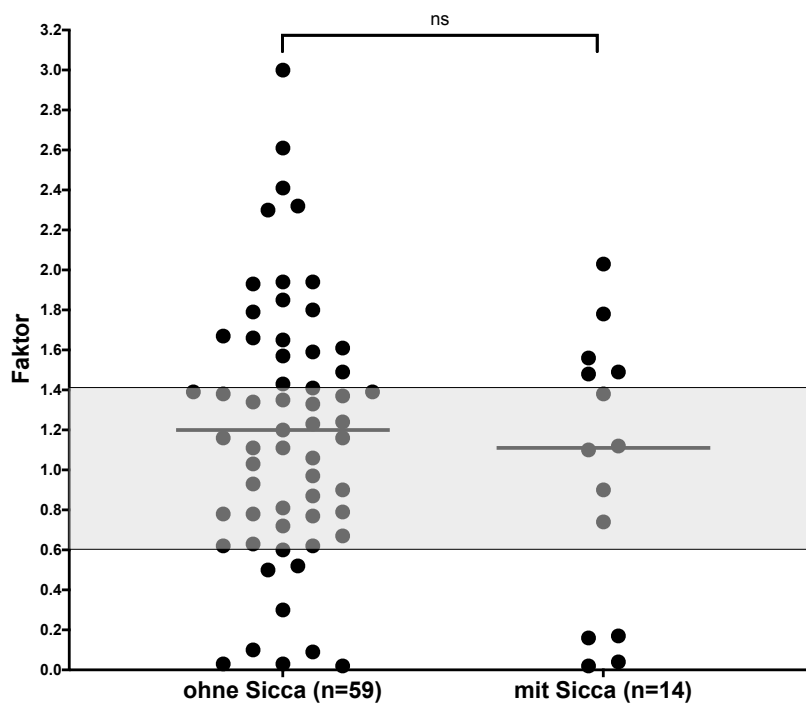


Abbildung 25: Reaktivität funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper bei SSc-Patienten mit und ohne Sicca-Symptomatik

(ns = nicht signifikant; - = Median)

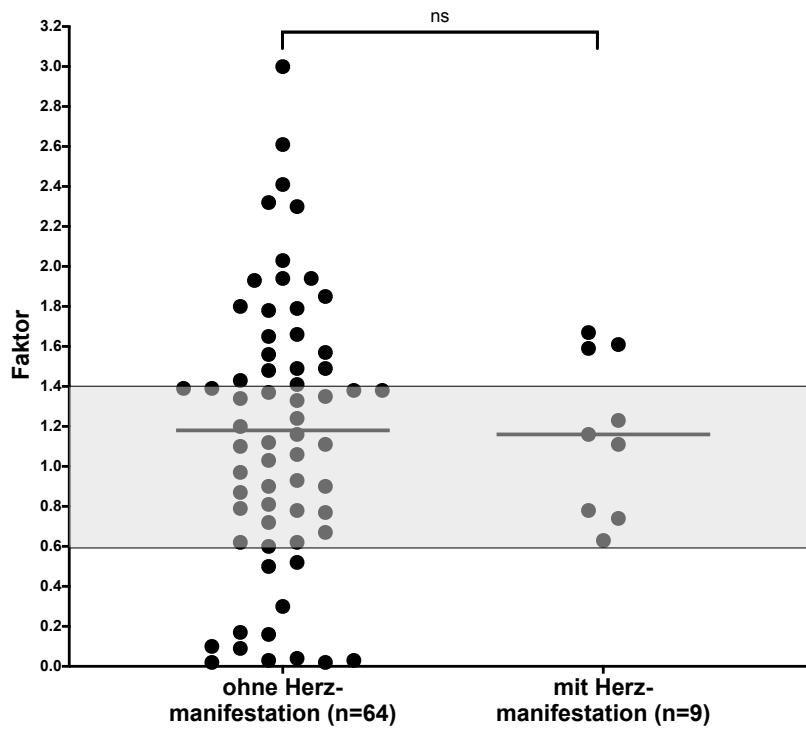


Abbildung 26: Reaktivität funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper bei SSc-Patienten mit und ohne Herz-manifestation

(ns = nicht signifikant; - = Median)

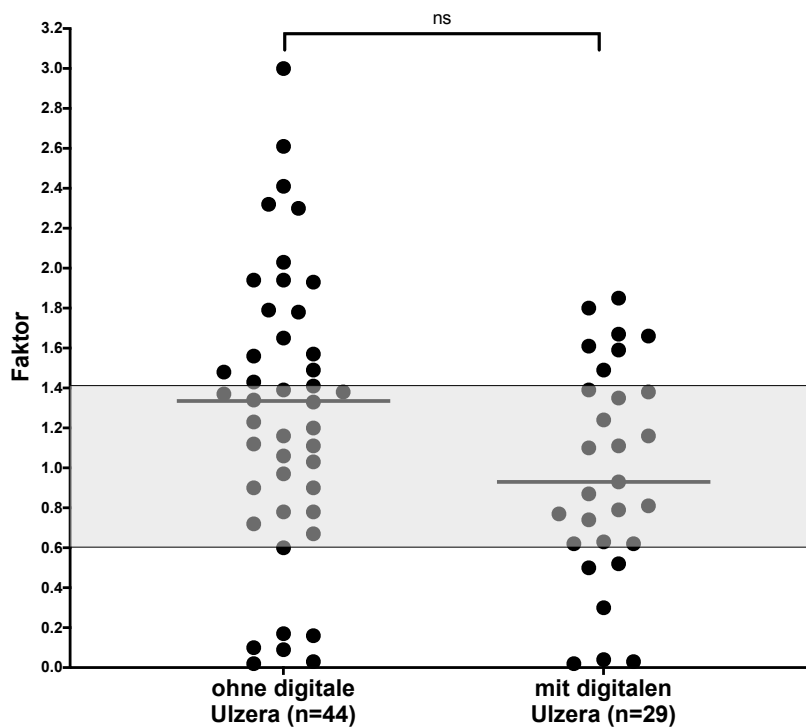


Abbildung 27: Reaktivität funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper bei SSc-Patienten mit und ohne digitale Ulzera

(ns = nicht signifikant; - = Median)

Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Reaktivität und Prävalenz der funktionellen Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper beim Vergleich von Patienten ohne und mit Hautmanifestationen, Kalzinose, Lungenmanifestation, PAH, Ösophagusmanifestation, Myositis, Sicca-Syndrom, Herzmanifestation oder digitaler Ulzera festgestellt (siehe Abb. 19–27).

#### **4.5 Einfluss einer autologen hämatogenen Stammzelltransplantation auf die Prävalenz und Reaktivität funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper bei Patienten mit SSc**

Die Ig von SSc-Patienten, die eine therapeutische aHSZT erhalten hatten (n = 28), wurden im funktionellen AT<sub>1</sub>R-Assay auf reaktive Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper untersucht. 21 der Patienten hatten einen günstigen Verlauf, 7 einen Relaps oder Progress nach aHSZT [155]. Untersucht wurden Ig der Patienten vor der aHSZT und zu verschiedenen Zeitpunkten (Zp) nach der aHSZT (Zp1: 5–9 Monate, n = 24; Zp2: 10–17 Monate, n = 19; Zp3: 18–24 Monate, n = 16). Ziel war es, die Prävalenz und Reaktivität der funktionellen Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper im Verlauf der Therapie zu analysieren.

Vor der aHSZT (ZP0) konnten bei 68 % der SSc-Patienten stimulierende, bei 4 % inhibierende Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper nachgewiesen werden. Nach der aHSZT änderte sich die Häufigkeit der stimulierenden oder inhibierenden Antikörper nicht signifikant (siehe Tabelle 12).

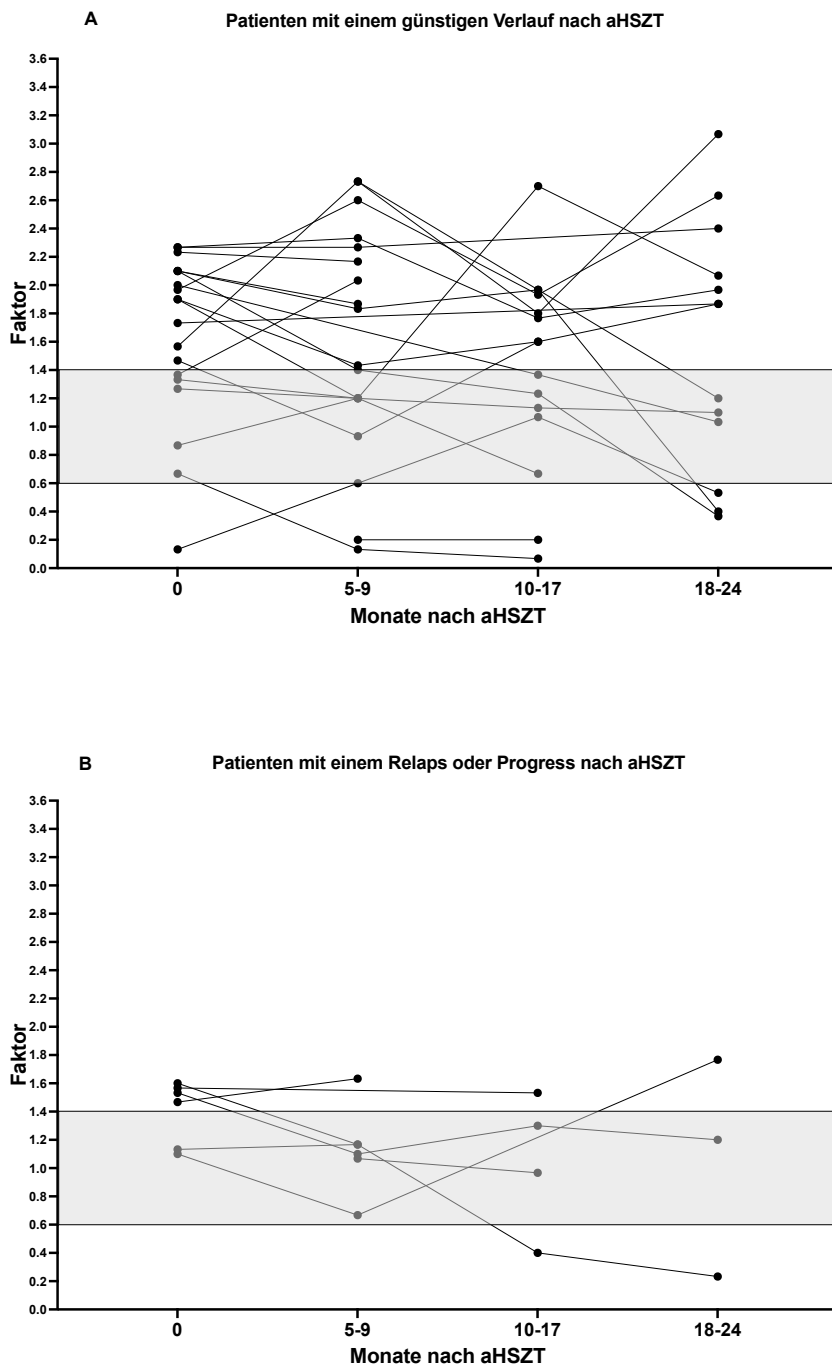
Auch die Reaktivität änderte sich nicht signifikant (siehe Abbildung 28).

**Tabelle 12: Prävalenz stimulierender und inhibierender Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper vor und nach aHSZT bei Patienten mit SSc**

	<b>funktionelle Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper, Anzahl (%)</b>	
	stimulierend	inhibierend
<b>ZP0 (n = 25)</b>	17 (68)	1 (4)
<b>ZP1 (n = 24)</b>	11 (46)	2 (8)
<b>ZP2 (n = 19)</b>	9 (47)	3 (16)
<b>ZP3 (n = 16)</b>	8 (50)	4 (25)







**Abbildung 29: Verlauf der Reaktivität funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper nach einer aHSZT bei Patienten mit SSc**

Die erzielten Faktoren der Patienten (in Punkten dargestellt) wurden mit Linien verbunden, um die Entwicklung der Reaktivität der funktionellen Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper darzustellen. In Abbildung A sind die Patienten mit einem günstigen Verlauf (n = 28), in Abbildung B die Patienten mit einem Relaps oder Progress nach aHSZT (n = 7) dargestellt. In beiden Gruppen konnte keine Trendentwicklung der Reaktivität funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper nach einer aHSZT identifiziert werden. Der graue Bereich definiert den Normbereich.

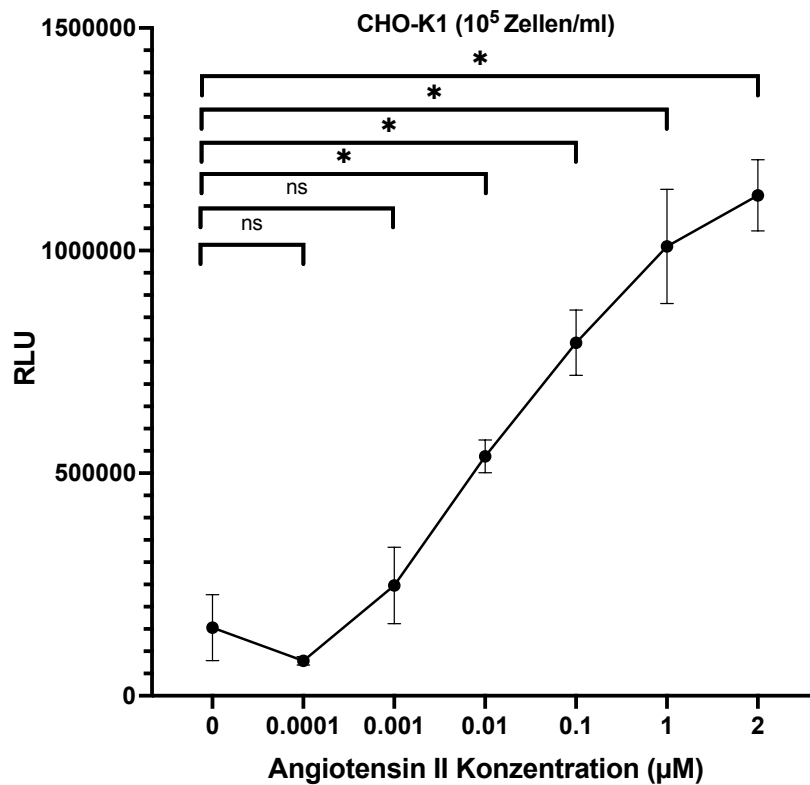
Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass bei 68 % der Patienten mit schwerer SSc stimulierende Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper nachweisbar waren. Diese wurden durch eine aHSZT nur vorübergehend und nicht signifikant reduziert. Der Nachweis der funktionellen Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper vor der aHSZT stellt keinen prognostischen Parameter für den Verlauf nach der Transplantation dar [182].

#### **4.6 Optimierung des Luciferase-Assays**

Der Luciferase-Assay wurde auf Grundlage der Arbeit von Alfredo Leañós-Miranda in mehreren Schritten mit den Zellreihen CHO-K1 und Huh-7 optimiert [176].

##### ***4.6.1 Vergleich der CHO-K1- und Huh-7-Zellreihen***

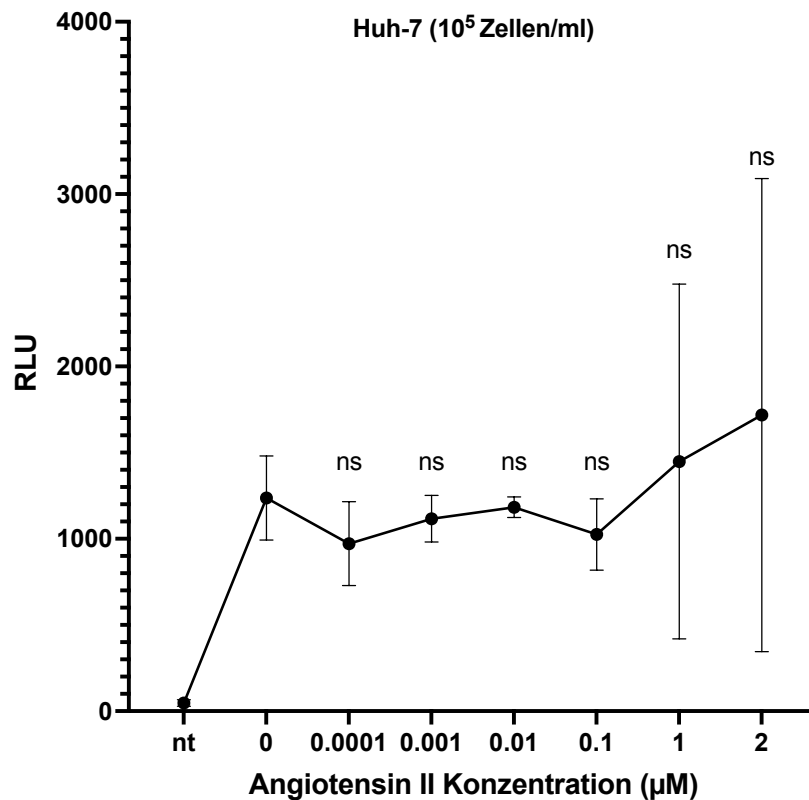
Im nachfolgend beschriebenen Versuch wurde der Luciferase-Assay mit den Zellreihen CHO-K1 und Huh-7 durchgeführt. Die CHO-K1 wurden mit dem pGL3-NFAT-Plasmid und AT<sub>1</sub>R-Plasmid co-transfiziert. Die Huh-7-Zellen wurden nur mit dem pGL3-NFAT transfiziert, da die Zellen auf ihrer Plasmamembran bereits den AT<sub>1</sub>R exprimieren. Ziel war es, herauszufinden, welche Zelllinie sich besser für den Luciferase-Assay eignet.



**Abbildung 30: Luciferase-Assay mit CHO-K1-Zellen und aufsteigenden Angiotensin-II-Konzentrationen**

Der Assay wurde wie in Kapitel 3.3.5 beschrieben mit einer Konzentration von 10<sup>5</sup> Zellen/ml durchgeführt. Die CHO-K1-Zellen wurden mit aufsteigenden ATII-Konzentrationen (µM) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils vier Einzelmessungen und die Standardabweichungen (\*signifikant vs. unbehandelte Zellen mit p\* < 0,05; ns = nicht signifikant; RLU = relative Lumineszenz-Unit).

Verglichen mit den CHO-K1-Zellen ohne die Zugabe von ATII induzierte bereits eine ATII-Konzentration von 0,01 µM eine signifikant stärkere zelluläre Transkription des pGL3-NFAT-Plasmids sowie eine Transkription des AT<sub>1</sub>R-Plasmids mit anschließender Expression des AT<sub>1</sub>R auf der Plasmamembran der CHO-K1. Weitere ATII-Konzentrationssteigerungen (0,1–2 µM) bewirken signifikant höhere RLU, bis zum 7,3-Fachen (2 µM ATII) des Ausgangswertes (siehe Abbildung 30).



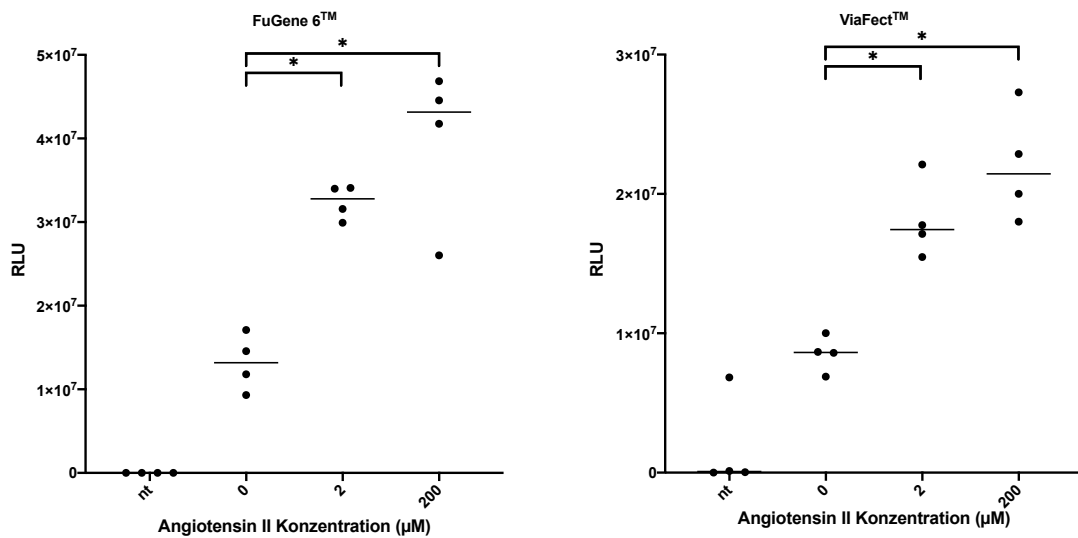
**Abbildung 31: Luciferase-Assay mit Huh-7-Zellen und aufsteigenden Angiotensin-II-Konzentrationen**  
 Der Assay wurde wie in Kapitel 3.3.5 beschrieben mit Huh-7-Zellen durchgeführt.  $10^5$  Zellen/ml wurden mit aufsteigenden ATII-Konzentrationen ( $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Die unterschiedlichen RLUs wurden vierfach bestimmt und der Mittelwert sowie die Standardabweichung (MW: Punkte; SD: vertikale Linien) wurden gebildet (nt = nicht transfiziert; ns = nicht signifikant; RLU = relative Lumineszenz-Unit).

Keine der verwendeten ATII-Konzentrationen führte zu einer messbaren Aktivierung der Transkription verglichen mit den unbehandelten Zellen (siehe Abbildung 31). Das pGL3-NFAT-Plasmid und damit auch die zelluläre Transkription konnten bei den Huh-7-Zellen nicht durch ATII stimuliert werden. Von einer erfolgreichen Transfektion ist jedoch auszugehen, da die nicht transfizierten Huh-7-Zellen eine signifikant geringere RLU aufwiesen als die transfizierten Huh-7-Zellen (MW nicht transfiziert: 47; transfiziert mit 0- $\mu\text{M}$ -ATII: 1221).

Aus dem Vergleich der beiden Versuche mit den Zelllinien CHO-K1 und Huh-7 lässt sich schlussfolgern, dass gute Ergebnisse mit den CHO-K1-Zellen erzielt werden konnten. Daher wurden die weiteren Versuche mit den CHO-K1-Zellen und einer ATII-Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  durchgeführt.

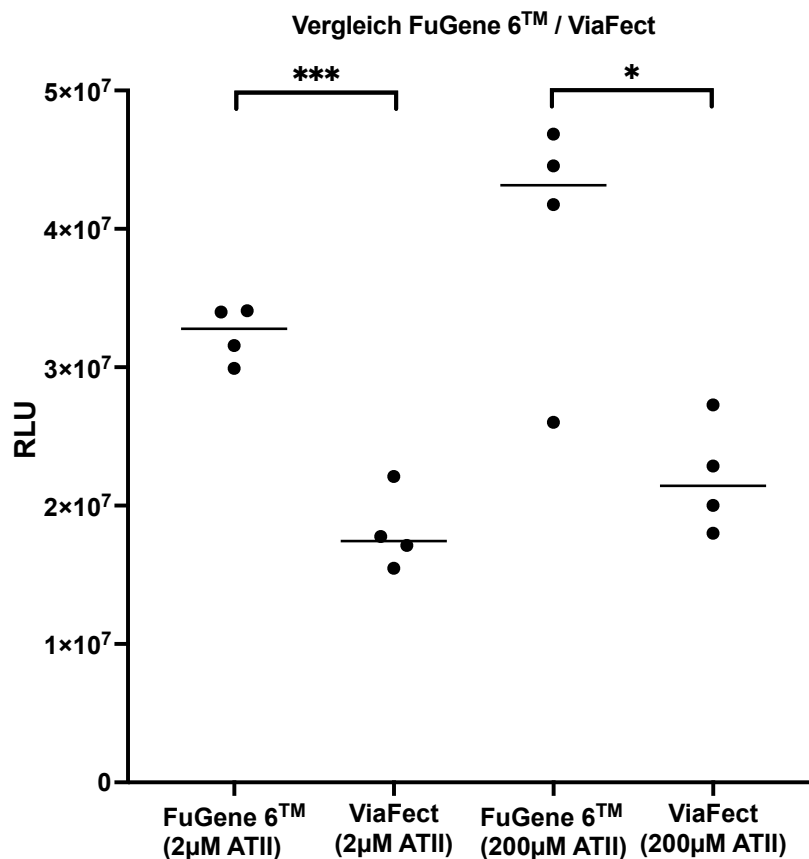
#### 4.6.2 Vergleich der Transfektionsreagenzien FuGene 6<sup>TM</sup> und ViaFect<sup>TM</sup>

Zur Optimierung des Luciferase-Assays wurde die Transfektion mit den Transfektionsreagenzien FuGene 6<sup>TM</sup> und ViaFect<sup>TM</sup> durchgeführt (siehe Abbildung 32). Die CHO-K1 wurden mit dem pGL3-NFAT-Plasmid und dem AT<sub>1</sub>R-Plasmid co-transfiziert, wobei ATII-Konzentrationen von 0 µM, 2 µM und 200 µM verwendet wurden. Als Kontrolle der Transfektion dienten nicht transfizierte CHO-K1.



**Abbildung 32: Luciferase-Assay mit den Transfektionsreagenzien FuGene 6<sup>TM</sup> und ViaFect<sup>TM</sup>**  
 ATII wurde in Konzentrationen zwischen 0 und 200 µM verwendet und jeweils vierfach bestimmt. Als Kontrolle der Transfektion dienten nicht transfizierte CHO-K1 (nt = nicht transfiziert; RLU= relative Lumineszenz-Unit; p\* < 0,05; - = Median).

In beiden Versuchen waren die RLUs der nicht transfizierten CHO-K1 signifikant niedriger als die der transfizierten CHO-K1, weshalb von einer erfolgreichen Transfektion auszugehen ist. In beiden Fällen konnten die Messwerte transfizierter CHO-K1 ab einer ATII-Konzentration von 2 µM gegenüber den CHO-K1 ohne Zugabe von ATII signifikant gesteigert werden. Die RLUs der mit FuGene 6<sup>TM</sup> transfizierten Zellen lagen im Schnitt höher und die Streuung war bei einer ATII-Konzentration von 2 µM geringer.



**Abbildung 33: Vergleich der Transfektionsreagenzien FuGene 6™ und ViaFect™ im Luciferase-Assay**

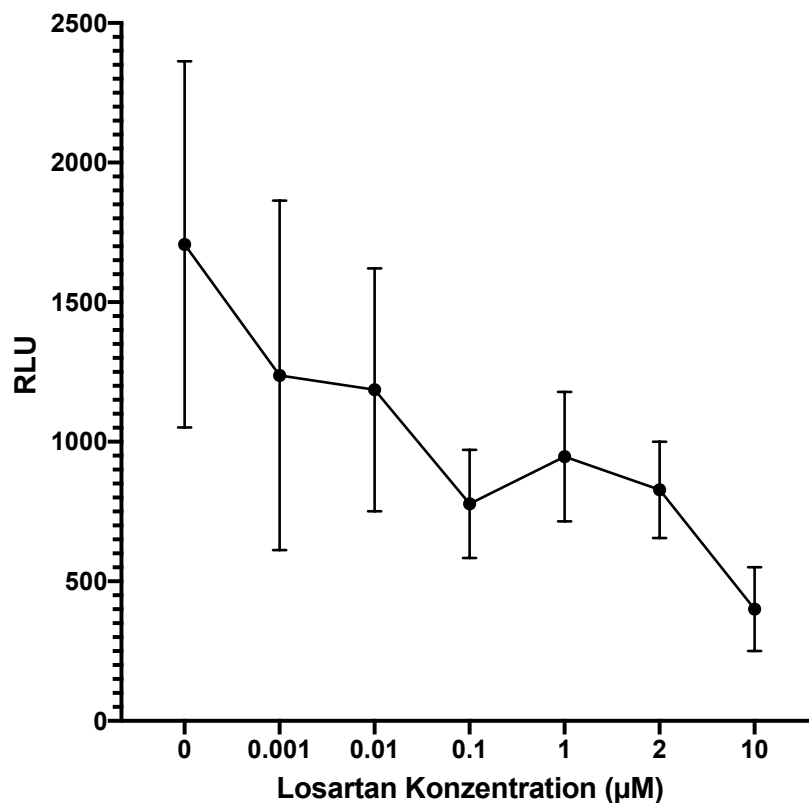
ATII wurde in Konzentrationen zwischen 0 und 200 µM verwendet und jeweils vierfach bestimmt (RLU = relative Lumineszenz-Unit;  $p^* < 0,05$ ;  $p^{***} < 0,001$ ; - = Median).

Unter Verwendung des Transfektionsreagenz FuGene 6™ und unter Zugabe von 2-µM-ATII ( $p = 0,0002$ ) und 200-µM-ATII ( $p = 0,0134$ ) konnten signifikant höhere RLU im Luciferase-Assay gemessen werden, verglichen mit ViaFect-transfizierten CHO-K1 (siehe Abbildung 33).

Schlussfolgernd lässt sich festhalten, dass mit beiden Transfektionsreagenzien zufriedenstellende Ergebnisse erzielt wurden. Unter Zugabe von ATII konnte eine vermehrte Transkription des pGL3-NFAT-Plasmids erzielt werden, was in Form von RLUs gemessen wurde. Da das Transfektionsreagenz FuGene 6™ im Vergleich zu ViaFect höhere RLUs erzielte, kostengünstiger war und bereits im AT<sub>1</sub>R-Assay verwendet wurde, wurden die weiteren Versuche mit FuGene 6™ fortgeführt.

#### 4.6.3 Validierung des AT<sub>1</sub>R auf den CHO-K1-Zellen im Luciferase-Assay

Zur Validierung des Luciferase-Assays wurden die CHO-K1-Zellen eine Stunde vor der Zugabe von ATII mit steigenden Losartan-Konzentrationen inkubiert. Losartan ist ein kompetitiver Antagonist des AT<sub>1</sub>R und konkurriert somit mit ATII um die Bindung am AT<sub>1</sub>R.



**Abbildung 34: Validierung des Luciferase-Assays mit AT<sub>1</sub>R/pGL3-NFAT-co-transfizierten CHO-K1-Zellen mittels Losartan**

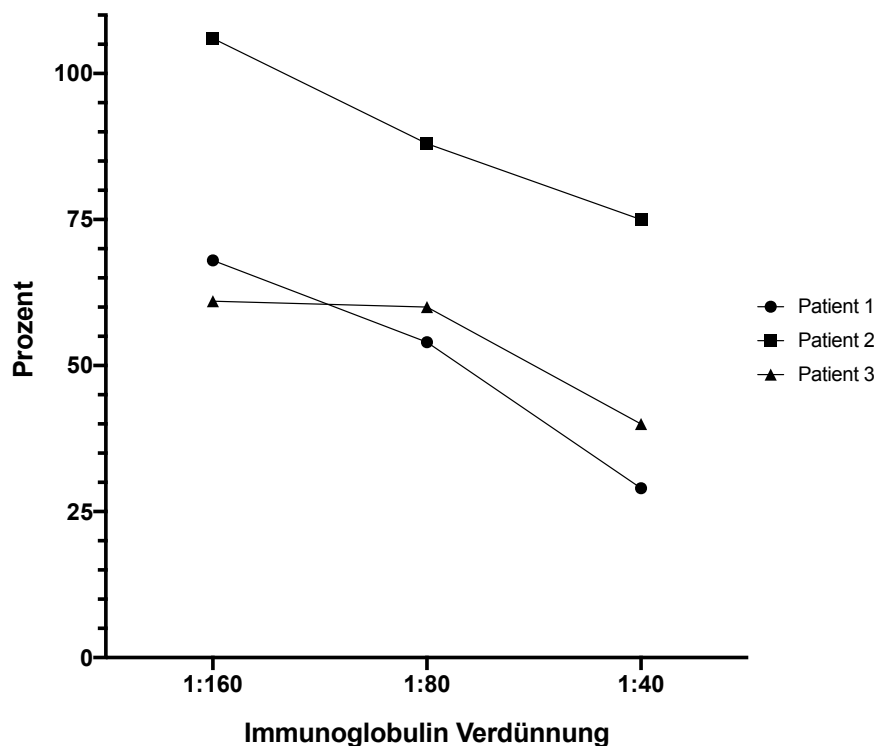
Abgebildet sind die Mittelwerte aus jeweils vier Einzelmessungen und die Standardabweichungen (RLU = relative Lumineszenz-Unit).

Eine Losartan-Konzentration von 0,001 μM induzierte bereits eine Hemmung der RLU verglichen derer CHO-K1-Zellen, denen kein Losartan zugegeben worden war (siehe Abbildung 34). Weitere Steigerungen der Losartan-Konzentration führten zu einer weiteren Reduktion der RLU. Aufgrund der Hemmung der RLU durch Losartan ist von einer Expression des AT<sub>1</sub>R auf der Plasmamembran der CHO-K1 auszugehen.



#### 4.6.4 Optimierung der Immunglobulin-Verdünnung

Zur Ermittlung der optimalen Ig-Verdünnung wurden die CHO-K1-Zellen exemplarisch mit Ig von drei SSc-Patienten inkubiert. Die Ig wurden in Endverdünnungen von 1 : 160, 1 : 80 und 1 : 40 hinzugegeben. Die Messungen wurden als Vierfach-Bestimmungen durchgeführt und mit den Ergebnissen ohne Zugabe von Ig verglichen (siehe Abbildung 35).



**Abbildung 35: Ermittlung der optimalen Immunglobulin-Verdünnung für das Luciferase-Assay mit AT<sub>1</sub>R/pGL-NFAT-co-transfizierten CHO-K1-Zellen**

Es wurden die Ig von drei Patienten mit SSc vierfach bestimmt und der Mittelwert wurde gebildet. Die Ig wurden in den Verdünnungen 1 : 160 bis 1 : 40 verwendet. Zur Assay-Normalisierung wurde der Mittelwert in Relation zu dem von CHO-K1-Zellen ohne die Zugabe von Ig gesetzt und in Prozent angegeben.

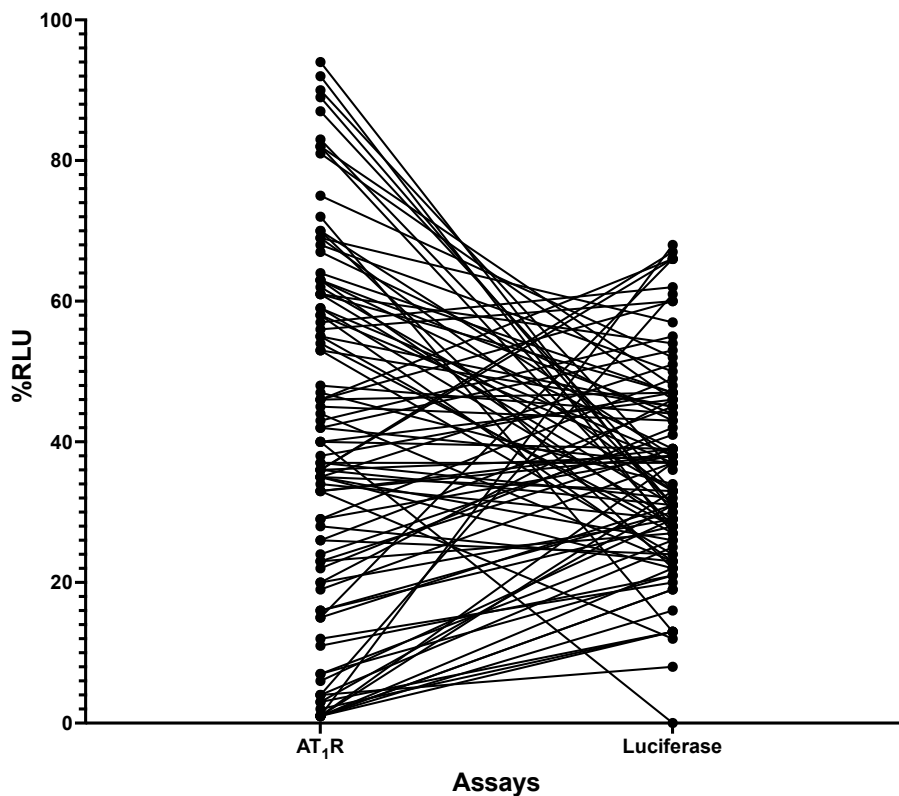
Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils vier Einzelmessungen. Gemessen wurden Igs von drei Patienten mit SSc. Das Signal ohne Zugabe von Ig wurde als 100 % definiert. Eine Ig-Verdünnung von 1 : 160 induzierte bei den Patienten 1 und 3 eine Hemmung der RLU auf 61 % (Patient 1) bzw. 68 % (Patienten 3) des Ausgangssignales (RLU). Die Ig von Patient 2 in der Verdünnung 1 : 160 stimulierten die Zellen um 6 % auf 106 % des ursprünglichen Signales. Weitere Steigerungen der Ig-Konzentration auf 1 : 80 und 1 : 40 induzierten in allen

Patienten eine Hemmung des Signales, wobei die Ig des Patienten 2 eine deutlich geringe Hemmung aufwiesen.

Für die weiteren Versuche wurde eine Ig-Verdünnung von 1 : 40 gewählt, da eine solche Verdünnung bereits im AT<sub>1</sub>R-Assay verwendet worden war und die Assays somit vergleichbarer waren. Zudem ermöglicht die Ig-Verdünnung eine Differenzierung der Funktionalität der Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper.

#### 4.6.5 Vergleich des Luciferase-Assays mit dem AT<sub>1</sub>R-Assay

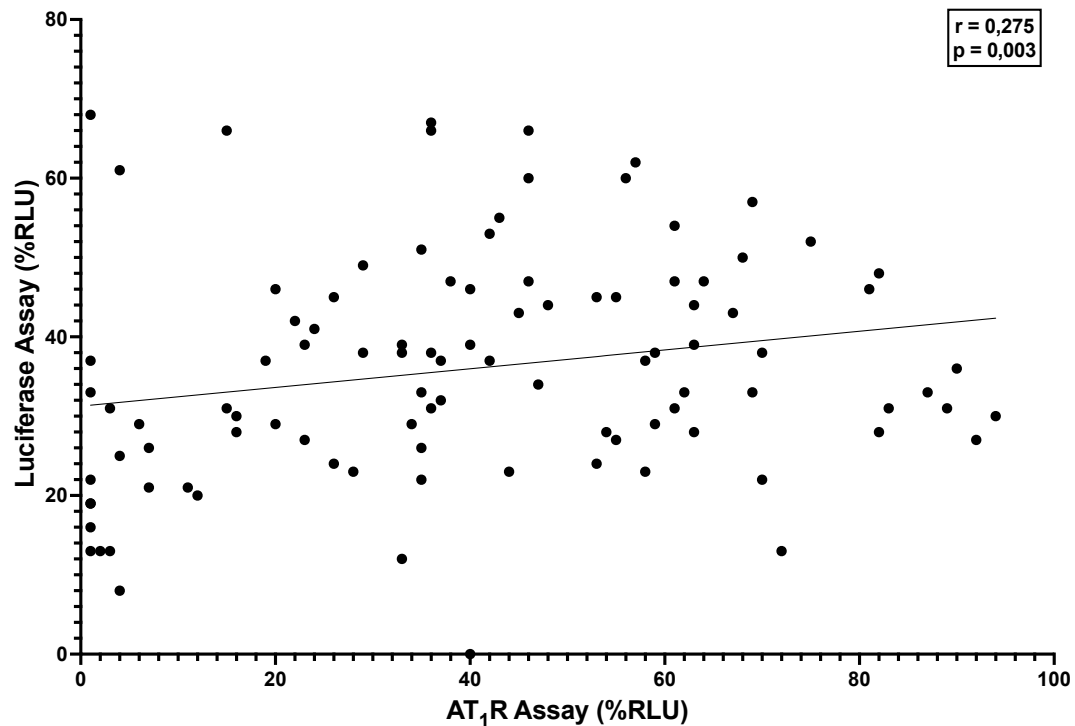
Zum Vergleich der beiden Assays wurde die Antikörper-Reaktivität von 55 Patientenseren in den beiden Assays untersucht (SSc: n = 32, SS: n = 2, PM: n = 5, MCTD: n = 3, nicht autoimmune Lebererkrankungen: n = 2, autoimmune Lebererkrankungen: n = 5, gesunde Probanden: n = 6).



**Abbildung 36: Vergleich des Luciferase-Assays mit dem AT<sub>1</sub>R-Assay**

Es sind die %RLU der beiden Assays dargestellt. Dazu wurden Patientenseren (SSc: n = 32, SSc mit aHSZT: n = 44, GP: n = 6, SS: n = 2, PM: n = 5, MCTD: n = 3, virale Hepatitis: n = 2, AIH: n = 3, PBC: n = 2) mit dem AT<sub>1</sub>R- und dem Luciferase-Assay auf funktionelle Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper untersucht und die beiden Assays miteinander verglichen.

Die %RLU des AT<sub>1</sub>R-Assay hatte eine größere Spannweite (Maximum: 94 %RLU, Minimum: 1 %RLU) als die des Luciferase-Assays (Maximum: 68 %RLU, Minimum: 0 %RLU; siehe Abbildung 36).

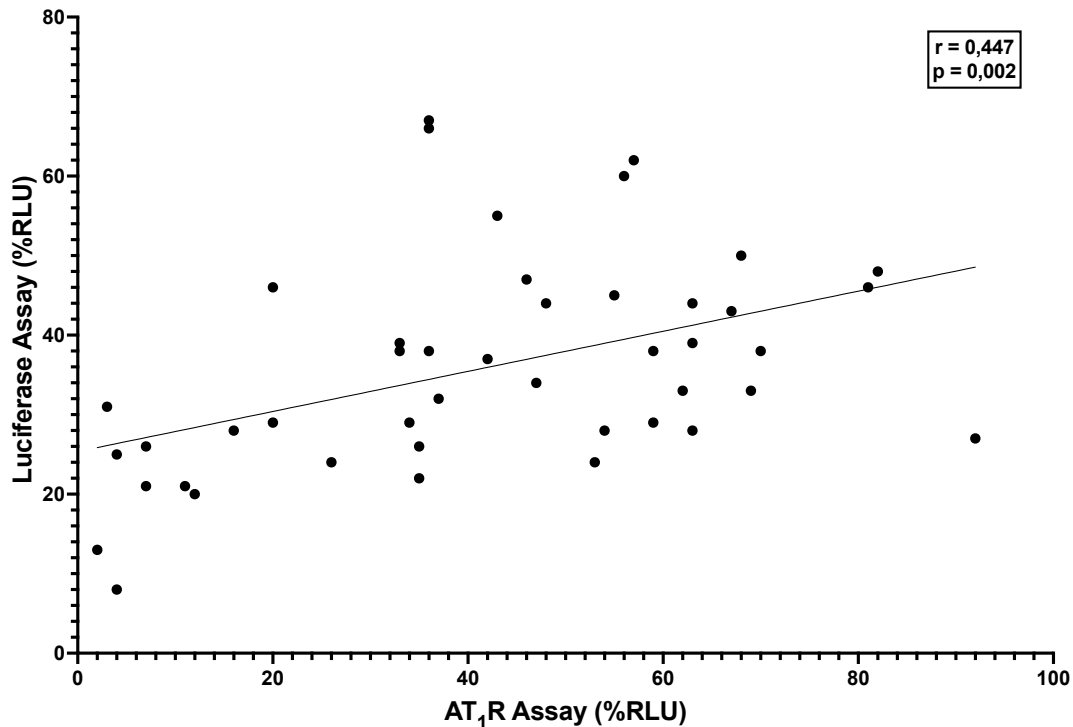


**Abbildung 37: Korrelationsanalyse des Luciferase- und des AT<sub>1</sub>R-Assays**

Die beiden Assays wurden mit den gleichen Patientenseren (SSc: n = 32, SSc mit aHSZT: n = 44, GP: n = 6, SS: n = 2, PM: n = 5, MCTD: n = 3, virale Hepatitis: n = 2, AIH: n = 3, PBC: n = 2) durchgeführt und die %RLUs mittels Spearmankorrelation verglichen ( $r = 0,275$ ,  $p = 0,003$ ).

Es besteht eine schwache Korrelation zwischen den %RLU der beiden Assays ( $r = 0,275$ ,  $p = 0,003$ ; siehe Abbildung 37).

#### 4.6.6 Vergleich der beiden Assays mit Seren von stammzelltransplantierten SSc-Patienten



**Abbildung 38: Korrelationsanalyse der beiden Assays mit Seren von stammzelltransplantierten SSc-Patienten**

Die %RLUs der beiden Assays wurden mittels Pearsonkorrelation ( $r = 0,447$ ,  $p = 0,002$ ) verglichen. Die Patienten, deren Seren getestet wurden hatten im Rahmen der SSc-Therapie eine autologe hämatologische Stammzelltransplantation erhalten.

Die Seren der Patienten, die im Rahmen der SSc-Therapie eine aHSZT erhalten hatten, wurden mit dem AT<sub>1</sub>R- und dem Luciferase-Assay untersucht. Die Aktivität der funktionellen Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper wurde prozentual im Vergleich zu einer Kontrolle (ohne Serum) angegeben. Der Vergleich der beiden Assays ergab eine Korrelation ( $r = 0,447$ ,  $p = 0,002$ ; siehe Abbildung 38).

## 5 Diskussion

In der Medizin werden zunehmend autoimmune Prozesse für das Auftreten verschiedener Erkrankungen verantwortlich gemacht. Eine besondere Klasse der Autoantikörper weist eine funktionelle Aktivität auf und richtet sich gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. In dieser Arbeit wurden zwei zellbasierte, funktionelle Assays entwickelt, um funktionelle, inhibitorische bzw. stimulatorische Anti-

AT<sub>1</sub>R-Antikörper nachzuweisen. Beide Assays basieren auf einer luminometrischen Methode. Die Assays sind standardisiert, eignen sich für die Routinediagnostik und liefern zuverlässig reproduzierbare Ergebnisse. Das AT<sub>1</sub>R-Assay mit Huh-7-Zellen misst die schnelle Zellantwort in Form eines intrazellulären Calcium-Einstroms, das Luciferase-Assay mit CHO-K1-Zellen ermittelt hingegen den Einfluss der Antikörper auf die intrazelluläre Transkription. Mithilfe der funktionellen Assays wurden Seren von Patienten mit SSc und anderen Erkrankungen auf funktionelle Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper hin untersucht.

### **5.1 Bisherige Methoden zum Nachweis funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper**

Die bisherigen Forschungen zum Nachweis funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R- und ET<sub>A</sub>1-Antikörper bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen basieren auf echten funktionellen Assays, den sogenannten Bioassays. Dragun et al. (2005) analysierten das Vorkommen von AT<sub>1</sub>R-stimulierenden Ig in Patientenserum bei Nieren-Allotransplantat-Abstoßung. Mithilfe eines Bioassays mit spontan schlagenden, kultivierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten, die den AT<sub>1</sub>R exprimieren, konnte der Einfluss der Ig auf den AT<sub>1</sub>R untersucht werden [183]. Analog dazu entwickelten Wallukat et al. (1999) einen Bioassay mit schlagenden, neonatalen Ratten-Kardiomyozyten zum Nachweis von AT<sub>1</sub>R-stimulierenden Ig in Frauen mit Präeklampsie [184]. Weitere Bioassays nutzen zum Nachweis von AT<sub>1</sub>R-stimulierenden Ig humane Koronararterien-Endothelzellen und vaskuläre Glattmuskelzellen [117, 183].

Da Bioassays jedoch zeitaufwendig und für den Routineeinsatz schwer zu standardisieren sind, wurden Festphasen-Assays mit Extrakten aus CHO-Zellen, die den humanen AT<sub>1</sub>R oder ET<sub>A</sub>1 überexprimieren, etabliert [117]. Mittlerweile sind diese Festphasen-Assays als ELISA kommerziell erhältlich und wurden bereits in mehreren Studien zum Nachweis von Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern verwendet [124, 185-187]. Becker et al. (2014) untersuchten mithilfe eines kommerziellen Festphasen-Assays das Vorkommen von Ig gegen den AT<sub>1</sub>R in Patienten mit SSc-assoziiertes PAH [124]. Fortführend wurden Festphasen-Assays genutzt, um die klinische Relevanz der Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper in Patienten mit Hypertonie [185], Alzheimer [186] und primärem Aldosteronismus zu untersuchen [187].

Festphasen-Assays sind zwar leicht zu standardisieren, geben aber keine Hinweise über die tatsächliche Funktionalität der isolierten Ig.

Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit wurden mithilfe von AT<sub>1</sub>R-exprimierenden Zellen Assays zum Nachweis funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper entwickelt. Im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Assays lässt sich mit den hier vorgestellten Assays nicht nur die Prävalenz der Antikörper bestimmen, sondern auch ihre Funktionalität; ferner eignen sie sich für den Einsatz in der Routinediagnostik.

## **5.2 AT<sub>1</sub>R-Assay**

Der entwickelte AT<sub>1</sub>R-Assay ist ein hochempfindlicher Funktionstest zum Nachweis eines durch G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren induzierten Ca<sup>2+</sup>-Anstiegs. Der Assay wurde mit lebenden Zellen durchgeführt und basiert auf Aequorin-Lumineszenz. Die durch Ca<sup>2+</sup> ausgelöste Lumineszenz des Photoproteins Aequorin [188] wurde im Jahre 1962 von Shimomura et al. (1962) entdeckt. Aequorin ist für Zellen harmlos und dient in Verbindung mit seinem Substrat Coelenterazin-h als Marker für die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung. Aus diesem Grund ist es in der Forschung seit mehr als 50 Jahren etabliert [189].

In einer Studie von Sandberg et al. (1988) wurde die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung durch ATII-spezifische und Neurotransmitterrezeptoren in *Xenopus laevis* Oozyten untersucht. Dabei wurde die mRNA der Rezeptoren zusammen mit dem Aequorin-Protein direkt in das Zytoplasma der Oozyten injiziert. In den Oozyten induzierte ATII einen Anstieg des zytosolischen Ca<sup>2+</sup>, das mithilfe von Aequorin luminometrisch gemessen wurde. Somit konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des AT<sub>1</sub>R durch dessen Agonist ATII funktionell mit der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung verbunden ist. Zudem konnte ein schneller und spezifischer Assay mit Aequorin-injizierten Oozyten entwickelt werden [190]. Aufgrund der Mikroinjektion des Aequorin in die Oozyten ist die Reproduzierbarkeit des Assays erschwert und der Durchsatz an Proben vermindert.

Button et al. (1993) nutzten zum Nachweis von intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung die Säugetierzelllinien CHO-K1, 293 und CSO. Die Zelllinien CHO-K1 und 293

wurden mithilfe von Cytomegalie-Viren stabil mit Aequorin-cDNA transfiziert. COS-Zellen wurden transient transfiziert. Alle Zelllinien exprimierten anschließend Apo-Aequorin-Protein, die transient transfizierten COS-Zellen jedoch größere Mengen. Durch die Behandlung der Zellen mit Coelenterazin-h konnte die Aequorin-Lumineszenz maximiert werden. Zudem war die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in adhärennten Zellkulturen besser als in Zellsuspensionen. So konnten Button et al. (1993) eine hochempfindliche und robuste Methode entwickeln, mit der die Aktivität von Agonisten und Antagonisten auf  $\text{Ca}^{2+}$ -assoziierten Rezeptoren in Zellkulturen gemessen werden kann [191].

Auf dieser Basis entwickelten Ungrin et al. (1999) einen sensiblen automatisierten Hochdurchsatz-Assay zur Funktionsanalyse von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zum Nachweis von intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung. Dieser Hochdurchsatz-Assay ermöglicht es, eine 96-Well-Platte in 70 Minuten fertigzustellen und somit eine große Anzahl an Proben zu analysieren [192].

Mithilfe einer Fluoreszenz-Echtzeitbildgebung, mit der die endotheliale zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gemessen wird, analysierten Becker et al. (2014) das Potenzial funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper zur Auslösung funktioneller Agonisteneffekte in Rattenlungen-Endothelzellen. Eine Induktion der Rattenlung-Endothelzellen mit IgG von SSc-Patienten induzierte einen starken Anstieg des endothelialen  $\text{Ca}^{2+}$ , der durch Valsartan gehemmt werden konnte [124].

Wie bereits beschrieben, wurden zum Nachweis funktioneller Autoantikörper zahlreiche Bioassays mit unterschiedlichen humanen und tierischen Geweben durchgeführt. Diese Assays weisen zwar die Funktionalität von Autoantikörpern nach, sind jedoch störanfällig und schwer zu standardisieren. Darüber hinaus ist die Verwendung tierischer Produkte in der Forschung nicht unumstritten. Die Verwendung von Zellkulturen mit standardisierten Zellzahlen, Transfektionsprotokollen und Umweltbedingungen ermöglichte es, den im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Assay zu standardisieren und weniger störanfällig zu machen.

Der in dieser Arbeit dargestellte AT<sub>1</sub>R-Assay wurde auf Grundlage der Arbeit von Preuss et al. (2014) entwickelt. Preuss et al. (2014) untersuchten Seren von

Patienten auf funktionelle Antikörper gegen den muskarinischen Acetylcholin-Rezeptor M3 mithilfe eines Aequorin-Lumineszenz-Assays [171]. In dieser Arbeit wurde der AT<sub>1</sub>R-Assay mit CHO5A und Huh-7-Zellen durchgeführt. CHO5A Zellen sind stabil mit dem Apo-Aequorin-Plasmid transfiziert und wurden zusätzlich transient mit einem AT<sub>1</sub>R-Plasmid transfiziert. Die Huh-7-Zellen exprimieren den AT<sub>1</sub>R auf ihrer Plasmamembran und wurden daher mit einem GFP/Aequorin transient transfiziert. Dies konnte mithilfe von Westernblots und AT<sub>1</sub>R-Assays unter Zugabe von Losartan zusätzlich validiert werden. Stabil transfizierte Zellen haben mehrere Vorteile, jedoch kommt es bei diesen zu einer Desensibilisierung von Signalwegen, weswegen eine regelmäßige Kontrolle der Proteinexpression und Funktionalität der Signalwege erfolgen muss [171]. Da die Ergebnisse der beiden Zellreihen vergleichbar waren und die Proteinexpression in transient transfizierten Zellen zuverlässig ist, wurden die weiteren Versuche mit Huh-7-Zellen durchgeführt, die aus menschlichem Gewebe stammen.

Der AT<sub>1</sub>R-Assay ist durch einige Variablen beeinflussbar. In Vorexperimenten wurde die Zellkonzentration bestimmt, bei der eine Konfluenz von 80 bis 90 % zwei Tage nach Transfektion im Well erreicht wurde. Zudem sollte der Zellgehalt hoch genug sein, um hohe RLUs zu erreichen. Zur weiteren Optimierung wurde das für den Assay optimale FuGene-6-zu-cDNA-Verhältnis bestimmt. So konnte die Empfindlichkeit des Assays weiter gesteigert werden. Coelenterazin-h, das Substrat für Aequorin, konnte ebenfalls die Empfindlichkeit des Assays erhöhen [193]. In der Arbeit von Preuss et al. (2014) wurden zwei Verfahren (AS-Fällung und Melon-Gel-IgG-Spin-Reinigungskit) zur Isolation von Ig untersucht. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Preuss et al. (2014) konnten in dieser Arbeit mit beiden Verfahren vergleichbare Resultate erzielt werden. Da die AS-Fällung kostengünstiger und weniger zeitintensiv ist, wurde diese Methode im Assay verwendet.

Zur Überprüfung des Gelingens der Transfektion dienten nicht transfizierte Zellen, deren RLU bei jeder Versuchsreihe auf der 96-Well-Platte gemessen wurde. Unterschieden sich die Ergebnisse der nicht transfizierten Zellen nicht signifikant von denen der transfizierten Zellen, wurde von einer nicht erfolgreichen



Transfektion ausgegangen und der Versuch wiederholt. Der MicroBeta<sup>2</sup> LumiJET misst die Lumineszenz in zwei Wells gleichzeitig. Dies hat den Vorteil, dass die Messdauer für eine 96-Well-Platte von 9,6 Minuten auf 4,8 Minuten verkürzt wird und somit die Inkubationszeit der Zellen vergleichbarer ist. Durch Messungenauigkeiten der zwei Sensoren könnten die Ergebnisse jedoch verfälscht werden. Um mögliche Messungenauigkeiten zu identifizieren, wurde in Vorversuchen überprüft, ob beide Sensoren gleiche Werte messen.

Die Variabilität zwischen einzelnen Testreihen ist bei Ganzzellentests aufgrund mehrerer Aspekte kritisch. Viele Faktoren beeinflussen die Qualität, die Konfluenz und die Expression transfizierter Proteine. Auch eine vermehrte Teilung oder das Alter der Zellen kann die Ergebnisse beeinflussen. Um die Variabilität der Versuchsreihen so niedrig wie möglich zu halten, wurden die Zellen für maximal drei Wochen in Kultur gehalten. Um den Stress für die Zellen zu minimieren, wurden diese nach dem Ernten, Auszählen und Transfizieren für 48 Stunden in Kulturmedium auf der 96-Well-Platte inkubiert. Die Konfluenz der Zellen wurde unter dem Mikroskop überprüft. War diese am zweiten Tag nach der Transfektion nicht gegeben, wurde der Versuch wiederholt. Die Reproduzierbarkeit wurde erhöht, indem die gemessenen Werte von transfizierten Zellen, zu denen kein Patientenserum hinzugegeben worden war, auf jeder 96-Well-Platte als Basiswerte genutzt wurden. Die gemessene Lumineszenz der Zellen unter Zugabe von Patientenseren wurde anschließend in Relation zu diesem Basiswert gesetzt. So konnte die Variabilität zwischen einzelnen Versuchsreihen und -tagen reduziert werden. Da eine Einzelbestimmung fehleranfälliger ist und Ausreißer bei lumino-metrischen Assays vorkommen können, wurden die Patientenproben vierfach bestimmt und der Mittelwert wurde gebildet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es gelungen ist, einen zuverlässigen und leicht standardisierbaren Assay zum Nachweis funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper zu entwickeln. Dieser ist für die Routinediagnostik geeignet und liefert reproduzierbare Ergebnisse.

### 5.3 Luciferase-Assay

Der Luciferase-Assay wurde ebenfalls zum Nachweis funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper entwickelt. Das Luciferase-Enzym wird aufgrund der hohen Empfindlichkeit, einfachen Anwendung und Kosteneffizienz häufig verwendet. Dabei dient das Gen der Firefly-Luciferase als Reporter gen, das die Expression anderer Gene zu überwachen hilft [194]. Verglichen mit dem AT<sub>1</sub>R-Assay wird in diesem Assay somit nicht direkt die Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung gemessen, sondern die Transkription des Promotors NFAT.

Leaños-Miranda et al. (2010) entwickelten einen neuen Bioassay zum Nachweis stimulierender Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper bei mexikanischen, mestizischen Frauen mit Präeklampsie mithilfe von AT<sub>1</sub>R- und 4xNFAT-Luciferase-Reporter gen-exprimierenden CO-K1- und HEK-293-Zellen. Unter der Zugabe von ATII zeigten beide Zelllinien einen spezifischen Anstieg der Luciferase-Expression, die bei Zugabe von Telmisartan abgeschwächt wurde. Somit lag ein luminometrisches Verfahren zum Nachweis stimulierender Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper vor [176].

Der Luciferase-Assay wurde mit den Zellreihen Huh-7 und CHO-K1 durchgeführt. Beide Zellreihen wurden mit dem pGL3-NFAT-Luciferase-Plasmid transient transfiziert, wobei die CHO-K1-Zellen zusätzlich mit dem AT<sub>1</sub>R-Plasmid co-transfiziert wurden. Zur Optimierung der Reproduzierbarkeit und der Sensitivität wurden verschiedene Parameter des Assays variiert. Deckungsgleich mit den Ergebnissen von Lam et al. (2008) wurde in weißen 96-Well-Platten mit transparenten Böden eine höhere Lumineszenz gemessen als in schwarzen 96-Well-Platten mit transparenten Böden [195]. Die Ergebnisse zeigen, dass es aufgrund der höheren Lumineszenz in den weißen Platten zu einem Cross-Talk zwischen den Wells kam, wodurch die Ergebnisse verfälscht wurden und die Variabilität zunahm. Durch das Verwenden schwarzer 96-Well-Platten konnte die Variabilität zwischen den Versuchsreihen vermindert werden. Die beiden Zellreihen CHO-K1 und Huh-7 wurden mit aufsteigenden ATII-Konzentrationen untersucht. Die Huh-7-Zellen zeigten keinen ATII-induzierten, dosisabhängigen Anstieg der Luciferase-Expression. Ursächlich hierfür könnte die in der Literatur beschriebene verminderte Expression von NFAT in HCC und entsprechenden Zelllinien sein

[196]. Deckungsgleich mit den Ergebnissen von Leañós-Miranda et al. (2010) induzierte ATII ab einer Konzentration von 0,01  $\mu\text{M}$  einen  $\text{AT}_1\text{R}$ -vermittelten Anstieg der Luciferase-Expression in CHO-K1-Zellen. In Gegenwart von Losartan konnte eine dosisabhängige Abschwächung der Luciferase-Expression erzielt werden, wodurch die Expression des  $\text{AT}_1\text{R}$  auf den CHO-K1 validiert wurde. CHO-K1-Zellen, die mittels ViaFect transfiziert wurden, führten laut Studien des Herstellers (Promega) zu einer stärkeren Luciferase-Expression als mit FuGene 6<sup>TM</sup> transfizierte CHO-K1 [197]. In der im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Studie konnten die CHO-K1 erfolgreich mit beiden Transfektionsreagenzien transfiziert werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen des Herstellers (Promega) konnten unter dem Einfluss von 2- und 200- $\mu\text{M}$ -ATII signifikant höhere RLU's mit FuGene-6<sup>TM</sup>-transfizierten CHO-K1 erzielt werden als mit ViaFect-transfizierten CHO-K1. Durch die Verwendung von FuGene 6 konnte somit die Sensitivität des Assays erhöht werden. Leañós-Miranda et al. (2010) nutzten eine IgG-Verdünnung von 1 : 10 und erzielten eine starke Hemmung der Luciferase-Lumineszenz. Dabei konnte kein Unterschied in der Expression von Luciferase zwischen gesunden Schwangeren und Präeklampsie-Patientinnen identifiziert werden [176]. Vermutlich kam es bei einer zu hohen Konzentration von IgG zu einer unspezifischen Hemmung des  $\text{AT}_1\text{R}$ , wodurch die Sensitivität des Detektierens funktioneller Anti- $\text{AT}_1\text{R}$ -Antikörper vermindert wurde. In der Studie der hier vorgelegten Arbeit konnte hingegen unter Verwendung von AS-gefällten Patientenseren mit aufsteigenden Konzentrationen eine Dosis-Wirkungs-Kurve erzielt werden. Da luminometrische Tests eine gewisse Variabilität aufweisen, wurden die Patientenseren vierfach bestimmt und es wurde der Mittelwert gebildet. Biologische luminometrische Assays sind anfällig für äußere Einflüsse. Um die Variabilität zwischen einzelnen Versuchstagen zu minimieren, wurden auf jeder 96-Well-Platte drei Wells mit transfizierten Zellen ohne Zugabe von Patientenseren als Basiswert genutzt. Die gemessenen Ergebnisse wurden in Bezug zu diesem Basiswert gesetzt, womit die Variabilität zwischen einzelnen Versuchstagen reduziert werden konnte.

In dieser Arbeit konnte somit ein zellbasierter Hochdurchsatz-Luciferase-Assay zum quantitativen und qualitativen Nachweis funktioneller Anti- $\text{AT}_1\text{R}$ -Antikörper

entwickelt werden. Der Assay ermöglicht es, den Einfluss funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper auf den AT<sub>1</sub>R auf Ebene der Transkription zu beurteilen. Die Ergebnisse des Luciferase-Assays korrelierten mit den Ergebnissen des AT<sub>1</sub>R-Assays (siehe Kap. 4.6.5). Um jedoch den Einfluss von Autoantikörpern mittels Luciferase-Assays zu bestimmen, sollte ein größeres Patientenkollektiv untersucht werden.

#### **5.4 Spezifität des Odyssey- und In-Zell-Westernblots zum Nachweis der Expression des AT<sub>1</sub>R auf der Plasmamembran der Huh-7-Zellen**

Die im AT<sub>1</sub>R-Assay verwendeten Huh-7-Zellen exprimieren laut Expressions-Atlas den AT<sub>1</sub>R mit 33 Transkripten pro Million [198]. Zur weiteren Validierung wurden in dieser Arbeit ein In-Zell-Westernblot mit vitalen Huh-7-Zellen und ein Odyssey-Westernblot mit der Plasmamembran von Huh-7-Zellen durchgeführt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass die Huh-7-Zellen den AT<sub>1</sub>R auf natürliche Weise exprimieren. Der In-Zell-Westernblot ermöglicht einen quantifizierten In-situ-Nachweis von Proteinen. Zur Fixierung bzw. Permeabilisierung wurde Formaldehyd oder Methanol verwendet. Außerdem wurden native, nicht fixierte Huh-7-Zellen genutzt. Die einzelnen Methoden wurden dreifach bestimmt. Zum Ausschluss unspezifischer Bindungen dienten Huh-7-Zellen, die nur mit einem sekundären Antikörper inkubiert worden waren. In einer Studie von Egorina et al. (2006) ist eine verminderte Immunfluoreszenzfärbung bei Zellen, die mit Formaldehyd fixiert wurden, beschrieben. Als Ursache dafür wurde eine Formaldehyd-Vernetzung der Makromoleküle in den Zellen genannt. Kommt es somit zur Beteiligung des Antikörper-spezifischen Epitopes, wird die antigene Eigenschaft und somit die Immunfluoreszenz abgeschwächt [199]. Im Gegensatz zur Studie von Egorina et al. (2006) konnte bei mit Formaldehyd permeabilisierten Zellen eine stärkere Immunfluoreszenz gemessen werden als bei mit Methanol permeabilisierten oder nativen Zellen. Der Grund dafür könnte eine fehlende Beteiligung des AK-spezifischen Epitopes bei der Quervernetzung der Makromoleküle durch Formaldehyd sein. Mithilfe des In-Zell-Westernblots konnte die Expression des AT<sub>1</sub>R auf den Huh-7-Zellen bestimmt werden. Um die Expression des AT<sub>1</sub>R in Assays unter ähnlichen Bedingungen

nachzuweisen, wurde die gleiche Huh-7-Zellkonzentration wie im AT<sub>1</sub>R-Assay verwendet. Mit diesem In-Zell-Westernblot konnte zum ersten Mal die Bindung von Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern an Huh-7-Zellen nachgewiesen werden.

Zur weiteren Validierung des Rezeptors wurde ein Odyssey-Westernblot mit der isolierten Plasmamembran der Huh-7-Zellen durchgeführt.

In einigen Studien wurde der zweite extrazelluläre Loop des AT<sub>1</sub>R als Zieldomäne für spezifische, funktionelle Autoantikörper beschrieben. Wallukat et al. (1999) untersuchten Seren von Patientinnen mit Präeklampsie auf AT<sub>1</sub>R-stimulierende Antikörper. Mithilfe von überlappenden Peptiden des AT<sub>1</sub>R konnte das spezifische Epitop für Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper auf dem zweiten extrazellulären Loop identifiziert werden. Die stimulierende Wirkung der funktionellen Antikörper konnte dabei durch Losartan inhibiert werden [184]. Auch Dragun et al. (2005) beschreiben eine Bindung von allosterisch wirkenden Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern am zweiten extrazellulären Loop des AT<sub>1</sub>R bei Patienten mit refraktärer vaskulärer Allotransplantatabstoßung [183]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Plasmamembranen von Huh-7-Zellen als Antigen verwendet. Während das Antigen in einer Versuchsreihe mit SDS-Puffer auf 100 °C erhitzt wurde, wurde das Antigen in einer zweiten Versuchsreihe bei Raumtemperatur mit dem SDS inkubiert. In Anlehnung an publizierte Arbeiten wurde ein Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper verwendet, der den zweiten extrazellulären Loop in der immunogenen Range zwischen den Aminosäuren 101 bis 200 bindet [183, 184].

Wie schon im In-Zell-Westernblot konnte der AT<sub>1</sub>R auf der Plasmamembran der Huh-7-Zellen nachgewiesen werden. Die spezifische Bande zeigte sich bei ca. 48 kDa, wobei die des nicht erhitzten Antigens deutlicher war als die des erhitzten Antigens. Wie schon von Iannarone et al. (2019) beschrieben, kann es aufgrund einer thermischen Denaturierung der antigenen Stelle zu einer verminderten Bindung des spezifischen Antikörpers kommen [200].

Somit konnte mit beiden Westernblot-Analysen die Expression des AT<sub>1</sub>R auf den Huh-7-Zellen belegt werden. Die Huh-7-Zellen scheinen somit geeignet, um mittels AT<sub>1</sub>R-Assay Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper nachzuweisen.

## 5.5 Bedeutung funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper bei Patienten mit SSc

Die Lebensqualität von Menschen mit SSc wird häufig durch vaskuläre Komplikationen eingeschränkt. Durch den Einsatz von ACE-Hemmern, die in das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) eingreifen, indem sie die Umwandlung von ATI in ATII hemmen, konnte die Sterblichkeit infolge einer Nierenkrise reduziert werden [66]. Aus diesem Grund wurden mehrere Studien durchgeführt, um einen möglichen Einfluss des RAAS auf den Pathomechanismus der SSc zu untersuchen [117, 122]. In einer Studie von Kawaguchi et al. (2004) konnten bei Patienten, die an der dcSSc erkrankt waren, signifikant höhere ATII-Spiegel nachgewiesen werden als bei Patienten mit GP oder lcSSc. Weitere immunhistochemische und Immunoblotting-Analysen detektierten vermehrt Angiotensinogen in der Haut der SSc-Patienten, aber nicht in der Haut gesunder Probanden. Dabei exprimierten die Fibroblasten der Patienten mit hohen Serum-ATII-Spiegeln Angiotensinogen-mRNA. Eine mRNA-Expression des AT<sub>1</sub>R wurde in den Fibroblasten von sowohl SSc-Patienten als auch gesunden Probanden gefunden. Zudem konnte in kultivierten Fibroblasten durch exogene ATII-Stimulation des AT<sub>1</sub>R die Produktion von Typ-I-Prokollagen und transformierten Wachstumsfaktoren Beta 1 gesteigert werden. Diese Studie zeigt, dass die aberrante Produktion von ATII in dermalen Fibroblasten eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Gewebefibrose bei der SSc spielt [122].

Riemekasten et al. (2011) untersuchten mithilfe eines kommerziellen ELISA 478 SSc-Patienten auf Antikörper gegen den AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R. Alle Seren von SSc-Patienten wiesen höhere Spiegel von Anti-AT<sub>1</sub>R- und Anti-ET<sub>A</sub>R-Antikörpern auf als die Kontrollen. Es konnte eine schwache Korrelation ( $r = 0,142$ ,  $p = 0,014$ ) zwischen dem Alter der Patienten und dem Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper-Spiegel gemessen werden. Zusätzlich konnte eine leichte Korrelation ( $R = 0,191$ ,  $p = 0,001$ ) zwischen der Dauer der Erkrankung und den Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper-Spiegeln festgestellt werden. Weitere Analysen der Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörperspiegel und SSc-assoziierten Manifestationen ergaben, dass Patienten mit hohen Antikörperspiegeln vermehrt an der dcSSc erkranken. Außerdem haben sie ein hohes Risiko für die Entwicklung schwerer Komplikationen wie digitale Ulzera, PAH und

Lungenfibrose und es besteht eine höhere Wahrscheinlichkeit, an SSc-assoziierten Komplikationen zu sterben [117].

Ilggen et al. (2017) analysierten Seren von 93 SSc-Patienten mithilfe eines kommerziellen Solid-Phase-Sandwich-ELISA. Ziel der Arbeit war es, den Zusammenhang zwischen dem Serumspiegel von Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern und Krankheitsmanifestationen zu untersuchen. Dieser Zusammenhang konnte jedoch, im Gegensatz zu den Ergebnissen der bereits erwähnten Studie von Riemekasten et al. (2011), nicht bestätigt werden. Die medianen Serumspiegel der Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper von SSc-Patienten unterschieden sich nicht signifikant von denen der GP ( $p = 0,23$ ). Darüber hinaus zeigten sich keine Korrelationen der Serumspiegel von Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern mit dem Alter der SSc-Patienten ( $R = 0,165$ ,  $p = 0,14$ ). Auch die Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper-Spiegel im Serum von SSc-Patienten mit bzw. ohne Lungenbeteiligung oder lcSSc und dcSSc unterschieden sich nicht signifikant. Auch bestand kein Zusammenhang zwischen einem hohen Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper-Serumspiegel und einer Ösophagusmanifestation, einem positiven Kapillarmikroskopie-Befund oder einem RP. Es lag keine Korrelation zwischen dem Serum-Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper-Spiegel und den SSc-assoziierten Antikörpern Anti-Scl-70 und Anti-CenpB vor. Auch zwischen dem Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper-Spiegel und der Krankheitsdauer ( $P = -0,049$ ,  $p = 0,66$ ) bestand kein Zusammenhang. Weitere Untersuchungen belegten ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der Verteilung der Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper-Spiegel im Serum von Patienten mit und ohne digitale Ulzerationen ( $p = 0,19$ ) [201].

Analog zu der Studie von Ilggen et al. (2017) konnten in der Studie dieser Arbeit keine Korrelationen zwischen der Prävalenz bzw. Reaktivität funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper und klinischen Manifestationen (außer der Myositis) nachgewiesen werden. Dies stellt die Bedeutung funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper in Bezug auf den Pathomechanismus der SSc infrage. Es konnte jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit Myositis und Patienten ohne Myositis belegt werden. Bei Patienten mit Myositis konnten keine stimulatorischen Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper detektiert werden, bei 38 % der Patienten ohne Myositis waren hingegen stimulatorische Antikörper nachweisbar. Diese Ergebnisse lassen

darauf schließen, dass stimulatorische Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper protektiv in der Entwicklung einer Myositis wirken. Dieser These sollte in folgenden Studien nachgegangen werden.

Darüber hinaus konnten in dieser Studie keine Korrelationen von Patienteneigenschaften (Alter, Geschlecht, Unterform der SSc und Krankheitsdauer) und der Prävalenz sowie Reaktivität funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper identifiziert werden. Somit haben funktionelle Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper wahrscheinlich keine prognostische Bedeutung. Im Zusammenhang mit den Studien von Ilgen et al. (2017) und Riemekasten et al. (2011) gibt es Hinweise darauf, dass die mittels kommerziellen ELISA nachgewiesenen AT<sub>1</sub>R-Antikörper nicht mit der tatsächlichen Funktionalität, wie hier im Assay ermittelt, übereinstimmen.

Mit dem AT<sub>1</sub>R-Assay wurden die Seren von 73 SSc-Patienten und 36 gesunden Probanden auf funktionelle Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper untersucht. Im Serum von 52 % der SSc-Patienten konnten funktionelle Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper nachgewiesen werden: 18 % hatten inhibierende und 38 % stimulierende Antikörper (siehe Kap. 4.4.1). Ferner konnten in 22 % der Seren gesunder Probanden funktionelle Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper nachgewiesen werden. Insgesamt zeigten 14 % der Seren gesunder Probanden inhibitorische und 8 % stimulatorische Antikörper. Die Anzahl an funktionell aktiven Antikörpern und stimulatorischen Antikörpern war in Seren von SSc-Patienten signifikant ( $p < 0,05$ ) höher als in Seren gesunder Probanden (siehe Kap. 4.4.1).

Es konnten keine weiteren Korrelationen zwischen SSc-assoziierten Manifestationen oder Krankheitsaktivitäten identifiziert werden und das Signifikanzniveau der Prävalenz von Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern in Seren von SSc-Patienten und gesunden Probanden war niedrig ( $p < 0,05$ ). Aus diesen Gründen ist die pathogene und klinische Relevanz von Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern weiterhin fraglich. Zudem ist noch nicht bekannt, ob die in vitro nachgewiesenen Antikörper auch in vivo mit dem Rezeptor interagieren können. Studien zeigen, dass Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper die Phosphorylierung von ERK1/2 induzieren. Außerdem erhöhen Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper die Expression der Boten-RNA des transformierenden Wachstumsfaktors beta, des vaskulären Zelladhäsionsmoleküls 1 und von Interleukin 8 in



Endothelzellen [117, 124, 202]. Diese Beobachtung korreliert mit den Daten dieser Studie, im Rahmen derer in Seren von Patienten mit SSc überwiegend stimulierende Antikörper nachgewiesen wurden.

Interessanterweise konnten in dieser Studie funktionelle Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper auch bei Patienten mit weiteren Erkrankungen nachgewiesen werden (siehe Kap. 4.4.1).

## **5.6 Bedeutung von Autoantikörpern nach einer aHSZT bei Patienten mit SSc**

Die SSc ist eine progressive Erkrankung und geht mit einer hohen Mortalität einher. Therapeutisch gibt es nur wenig Optionen, um die Symptome zu verbessern oder die Erkrankung zu heilen [138]. Laut einer Fallbeschreibung von 1996 über einen Patienten mit Sharp-Syndrom kam es nach einer autologen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (aHSZT) zu einer deutlichen Symptomverbesserung [203]. Aus diesem Grund wurden anschließend verschiedene Studien zur Behandlung von AID mittels aHSZT durchgeführt [204-206]. Dabei zeigte sich in mehreren Studien ein positiver Effekt und teilweise eine Remission der AID [150, 151]. Aktuell ist die aHSZT eine wirksame Maßnahme zur Therapie der SSc, die allerdings mit einer hohen Mortalität verbunden ist [134]. Therapeutisch sollte eine aHSZT bei Patienten mit einer schlechten Prognose und vor Auftreten von Organmanifestationen in Erwägung gezogen werden [154]. Das primäre Ziel ist es, den Progress und die Krankheitsaktivität zu stoppen [156]. Der Grund für den Erfolg einer aHSZT scheint ein ‚Neustart‘ des Immunsystems mit einer Eradikation autoreaktiver Lymphozyten zu sein. Dabei soll die Infusion körpereigener Stammzellen die Bildung eines neuen antigennaiven Immunsystems aus den hämatopoetischen Stammzellen des Patienten induzieren. Erforderlich für die Rekonstruktion des Immunsystems ist die adäquate Ausreifung einer neuen Generation nicht autoreaktiver (antigennaiver) T-Zellen [157].

Unter dieser Annahme wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss einer aHSZT auf die Reaktivität und Prävalenz von Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern untersucht. Im weiteren Verlauf wurde überprüft, ob der Nachweis von Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern als prognostischer Biomarker für das *Outcome* nach der aHSZT genutzt werden

kann. Aktuell gibt es keine Studien, in denen das Verhalten funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper nach einer aHSZT analysiert wird. Auch gibt es keine Erkenntnisse, inwiefern das *Outcome* nach einer aHSZT mit der Prävalenz und Reaktivität funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper korreliert.

In einer Studie von Henes et al. (2017) wurde die Auswirkung einer nicht myeloablativen autologen Stammzelltransplantation auf die Reaktivität von Anti-Topoisomerase-Antikörpern (ATA) bei 18 Patienten mit SSc analysiert. Vor der Stammzelltransplantation wurden bei 15 Patienten mittels ELISA IgG- und bei 5 Patienten IgM-Antikörper gegen Topoisomerase I (volle Länge und trunkierte Topoisomerase I) nachgewiesen. Drei Patienten zeigten lediglich präzipitierende ATA in der Immundiffusion. Die Seren der Patienten wurden vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Stammzelltransplantation auf ATA getestet. Die Studie zeigt, dass eine aHSZT die Reaktivität und Spezifität von ATA bei Patienten mit SSc nicht beeinflusst [207].

Die Beobachtungen von Henes et al. (2017) stimmen mit den Ergebnissen der im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Studie überein. Allerdings wurden hier nicht die Prävalenz und die Reaktivität von ATA, sondern die Prävalenz und die Reaktivität von Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern untersucht. Vor der aHSZT konnten im Serum von 68 % der SSc-Patienten stimulierende und im Serum von 4 % inhibierende Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper nachgewiesen werden. Die hohe Prävalenz stimulierender Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper lässt sich dadurch erklären, dass eine aHSZT nur bei Patienten mit einem schweren progredienten Verlauf angewendet wird. Nach der aHSZT änderte sich die Prävalenz stimulierender Ak nicht signifikant (Zp1: 46 %, Zp2: 47 %, Zp3: 50 %). Auch die Prävalenz der inhibierenden Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper stieg nicht signifikant an (Zp1: 8 %, Zp2: 16 %, Zp3: 25 %). Außerdem wurde Reaktivität der Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper durch die aHSZT nicht signifikant beeinflusst (siehe Kap. 4.5).

Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass eine nicht myeloablativ autologe Stammzelltransplantation, wie in der Studie durchgeführt, nicht alle Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper-produzierenden B-Gedächtniszellen eliminiert. Eine Verminderung

der B-Gedächtniszellen während der Therapie könnte die kurzfristige Reduktion von Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern erklären.

Ferner konnten Henes et al. (2017) keine Korrelation zwischen der Reaktivität von ATA in Patienten mit SSc und dem klinischen *Outcome* nach aHSZT identifizieren [207]. Interessanterweise zeigen die Daten der vorliegenden Studie ebenfalls keine Korrelation zwischen dem *Outcome* und der Prävalenz funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper vor und nach aHSZT. Auch nahmen trotz guten klinischen Ansprechens der Patienten die Prävalenz und die Reaktivität der Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper nicht ab. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Vorhandensein und die Reaktivität funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper nicht als prognostische Biomarker für das *Outcome* nach aHSZT herangezogen werden können. Aufgrund der mangelnden Korrelation zwischen der Prävalenz oder der Reaktivität und dem *Outcome* ist fraglich, inwiefern Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper pathophysiologisch eine Rolle spielen.

### **5.7 Bedeutung von Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern bei weiteren Erkrankungen**

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass stimulierende Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper auch bei Patienten mit SLE, renaler Nierenabstoßung nach Allotransplantation, Präeklampsie, Hypertonie, Tumorleiden, Diabetes, Morbus Basedow, Endangiitis obliterans und Mukoviszidose zum Pathomechanismus der Erkrankung beitragen können [128, 179, 183, 185, 208-212].

In der hier vorgelegten Arbeit wurden neben den Seren von SSc-Patienten auch Seren von Patienten mit MCTD, SS, SLE, RA, PM, autoimmunen Lebererkrankungen (PBC, PSC und AIH) und nicht autoimmunen Lebererkrankungen (toxisch und viral) untersucht.

Xiong et al. (2013) analysierten retrospektiv die Expression und die klinische Bedeutung von Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern bei Patienten mit Lupus-Nephritis mittels ELISA. Die Ergebnisse zeigen, dass die Positivrate von Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern bei Patienten mit Lupus-Nephritis (66,29 %) deutlich höher war als die bei gesunden Probanden (9,64 %,  $p = 0,01$ ). In den Nierenbiopsien der Patienten ergaben sich keine Unterschiede zwischen Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper-positiven und Anti-

AT<sub>1</sub>R-Antikörper-negativen Patientengruppen. Da Patienten, bei denen Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper nachgewiesen wurden, signifikant höhere Spiegel von ACA und Anti-dsDNA-Antikörpern sowie einen erhöhten Blutdruck aufwiesen, wurde von einer erhöhten Krankheitsaktivität ausgegangen. Aufgrund der Datenlage ist jedoch unklar, ob erhöhte Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper-Spiegel zum Pathomechanismus der Lupus-Nephritis beitragen [128]. Riemekasten et al. (2011) konnten mittels ELISA höhere Spiegel von Anti-AT<sub>1</sub>R- und Anti-ET<sub>A</sub>R-Antikörpern in Patienten mit SS und RA verglichen mit gesunden Probanden feststellen ( $p = 0,001$ ) [117].

Im Gegensatz dazu konnte in dieser Studie mittels funktionellem AT<sub>1</sub>R-Assay keine erhöhte Reaktivität funktioneller Antikörper in Seren von Patienten mit SLE, SS und RA nachgewiesen werden. Ursächlich dafür könnte sein, dass in dem hier beschriebenen Assay ausschließlich funktionell aktive Antikörper ermittelt wurden. Autoantikörper, die mittels ELISA identifiziert werden, sind nicht unbedingt pathogen und werden im AT<sub>1</sub>R-Assay nicht erfasst. Diese nicht pathogenen Antikörper können zum Pool der natürlich vorkommenden Antikörper gehören und sogar schützend wirken [213-215]. Dies wurde auch schon für GPKR-bindende Antikörper beschrieben [216].

Entgegen der Erwartung konnte diese Studie zeigen, dass funktionelle Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper auch bei anderen Kollagenerkrankungen und sogar bei Lebererkrankungen auftreten. Interessanterweise war die Prävalenz funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper in 70 % der Seren von Patienten mit nicht autoimmunen Lebererkrankungen (toxisch oder viral) am höchsten. Bei 37 % der Seren konnten inhibierende und bei 33 % der Seren stimulierende Antikörper nachgewiesen werden (siehe Kap.4.4.1). Aktuell liegt keine Studie vor, in der die Prävalenz funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper in Patienten mit nicht autoimmunen Lebererkrankungen (nicht transplantiert) untersucht wurde. Die hohe Prävalenz von Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern in 70 % der Seren von Patienten mit viralen und toxischen Lebererkrankungen stützt die Hypothese, dass funktionell aktive Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper zum Pool der natürlich vorkommenden Antikörper gehören können. Frühere Studien haben jedoch gezeigt, dass der AT<sub>1</sub>R direkt an der Entwicklung der Leberfibrose beteiligt ist [217, 218]. Auch identifizierten Ohe et al. (2014) eine hohe

Konzentration an Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern in 65 % der Patienten mit fortgeschrittener Transplantatfibrose nach Immunsuppressionsentzug [219]. Da die untersuchten Patienten keine Lebertransplantation erhielten und somit keine HLA-Inkompatibilität zwischen Spenderleber und Leberempfänger besteht, sind die Ergebnisse dieser Studie nicht uneingeschränkt mit den Ergebnissen von Ohe et al. (2014) zu vergleichen. Bekannt ist jedoch, dass bakterielle und virale Infektionen die Produktion natürlicher Autoantikörper induzieren [220]. Dies könnte die erhöhte Prävalenz von Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern in Patienten mit nicht autoimmunen Lebererkrankungen erklären.

Außerdem zeigten die Seren von Patienten mit MCTD und PM eine signifikant höhere Aktivität funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper als die Seren gesunder Probanden ( $p < 0,05$ ). Aktuell gibt es keine Studien, auf deren Grundlage die pathogenetische Rolle von Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern bei MCTD oder PM beschrieben wird.

Im Gegensatz dazu deuten die Ergebnisse von Dimitrijevic et al. (2009) darauf hin, dass der AT<sub>1</sub>R eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Riesenzellarteriitis spielt [221], einer entzündlich rheumatischen Erkrankung der mittleren und großen Gefäße, die eng mit der PM verwandt ist und häufig in Verbindung mit dieser auftritt [222]. Inwiefern Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper pathogenetisch bei der PM beteiligt sind, ist weiterhin fraglich und sollte in weiteren Studien mit einem großen Patientenkollektiv untersucht werden.

Die MCTD ist eine Erkrankung, die durch die Überschneidung mehrerer Merkmale von Bindegewebserkrankungen, darunter SSc, SLE, PM und RA, gekennzeichnet ist [223, 224]. Studien zeigen, dass Patienten mit MCTD und SSc in ähnlicher Häufigkeit eine idiopathische Lungenerkrankung und PAH aufweisen [225]. Ferner kamen Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper häufiger in Patienten mit SSc und *connective tissue disease* mit PAH vor als in Patienten mit anderen Formen der PAH [124]. Da es bei SSc und MCTD einige krankheitsspezifische Überschneidungen und Merkmale gibt, ist es möglich, dass Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper bei der MCTD eine erhöhte Prävalenz haben oder sogar pathogenetisch relevant sind.

## 5.8 Schlussfolgerung und Ausblick

Autoantikörper gegen den AT<sub>1</sub>R wurden in mehreren Studien bei Patienten mit SSc nachgewiesen. Bislang ist aber noch nicht endgültig geklärt, inwiefern Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper pathogenetisch zur SSc beitragen. Die Fragestellung im Rahmen der Studie für diese Arbeit war daher, zu untersuchen ob Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern bei Patienten mit SSc und Patienten mit anderen Erkrankungen zur Pathogene beitragen. Ferner wurde untersucht, wie sich Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper bei Patienten mit SSc nach einer autologen hämatologischen Stammzelltransplantation (aHSZT) verhalten und ob sie als prognostischer Biomarker für das *Outcome* nach aHSZT von Bedeutung sind.

Die bisher verwendeten Methoden zum Nachweis funktionell aktiver Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper sind entweder aufwendige Bioassays, schwer zu standardisieren oder ELISA-basiert und somit zwar geeignet, die Prävalenz nicht aber die Funktionalität der Antikörper nachzuweisen. Somit war es ein Ziel dieser Arbeit, zuverlässige, reproduzierbare und leicht zu standardisierende Hochdurchsatzassays zum Nachweis funktionell aktiver Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper bei Patienten mit SSc und anderen Erkrankungen zu entwickeln. Insgesamt lässt sich sagen, dass es im Rahmen dieser Arbeit gelungen ist, zwei zellbasierte luminometrische Hochdurchsatzassays für diagnostische Zwecke bereitzustellen. Das AT<sub>1</sub>R-Assay misst den Einfluss der Antikörper in Form einer schnellen Ca<sup>2+</sup>-induzierten Zellantwort, wohingegen das Luciferase-Assay Hinweise auf den Einfluss der Antikörper auf transkriptioneller Ebene widerspiegelt. Mithilfe etablierter Westernblot-Analysen und der rezeptorspezifischen Hemmung des AT<sub>1</sub>R konnten die Assays zusätzlich validiert werden, womit deren Aussagekraft verstärkt wurde.

Insgesamt wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit 399 Seren untersucht, darunter Seren von Patienten mit rheumatologischen Erkrankungen und autoimmunen sowie nicht autoimmunen Lebererkrankungen. Auch wurden Seren von SSc-Patienten untersucht, die im Rahmen der SSc-Therapie eine aHSZT erhalten hatten. Als Kontrolle dienten Seren von gesunden Probanden. Verglichen mit gesunden Probanden konnte bei SSc-Patienten eine erhöhte Prävalenz funktionell aktiver Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper, insbesondere stimulierender Antikörper,

nachgewiesen werden. Die Reaktivität der Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper war in Seren von Patienten mit SSc, MCTD und PM signifikant höher als in Seren gesunder Probanden. Da keine Korrelation zwischen der Reaktivität von Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern und SSc-assoziierten Krankheitsmanifestationen oder Patienteneigenschaften identifiziert werden konnte, ist die pathogenetische Rolle funktionell aktiver Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper jedoch weiterhin fraglich. Die Fragestellung, inwiefern Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper bei Patienten mit MCTD und PM pathogenetisch relevant sind, sollte in einem großen Patientenkollektiv untersucht werden. Auch die hohe Prävalenz von Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern in Patienten mit autoimmunen, viralen und toxischen Lebererkrankungen sollte Anlass für weitere Forschung sein.

Weiterführend konnte gezeigt werden, dass die Reaktivität und die Prävalenz funktionell aktiver Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper nach einer aHSZT nicht signifikant sinken. Auch ergab sich keine Korrelation zwischen der Reaktivität der Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper und dem *Outcome* nach aHSZT. Somit lässt sich sagen, dass funktionelle Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper nicht als prognostischer Biomarker für das *Outcome* nach aHSZT herangezogen werden können.

## **6 Zusammenfassung**

In dieser Studie ist es gelungen, zwei zuverlässige und reproduzierbare Hochdurchsatzassays zum Nachweis funktionell aktiver Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper zu entwickeln. Mithilfe von AT<sub>1</sub>R-exprimierenden kultivierten Zellen konnte der Einfluss funktionell aktiver Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper aus Patientenseren auf den AT<sub>1</sub>R quantitativ bestimmt werden. Die Expression des AT<sub>1</sub>R wurde mit Westernblot-Analysen und einer spezifischen Hemmung des AT<sub>1</sub>R mit Losartan zusätzlich validiert.

Die Fragestellung dieser Arbeit bestand darin, inwiefern Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper in Patienten mit SSc funktionell aktiv sind und zur Pathogenese dieser Erkrankung beitragen. Ferner wurde analysiert, ob Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper als biologischer Marker für das *Outcome* nach autologer hämatologischer Stammzelltransplantation genutzt werden kann und wie sich die Antikörper im Verlauf nach der Therapie verhalten. Zusätzlich wurden Patienten mit weiteren rheumatischen Erkrankungen, nicht autoimmunen und autoimmunen Lebererkrankungen auf

funktionell aktive Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper untersucht. Zusätzlich wurden Seren von Patienten mit weiteren rheumatischen und chronisch inflammatorischen Lebererkrankungen auf die Prävalenz und die Reaktivität funktionell aktiver Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper analysiert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Seren von 73 SSc-Patienten auf funktionelle Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper untersucht. In den Seren von SSc-Patienten konnten signifikant mehr funktionell aktive (52 %) und stimulierende (34 %) Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper identifiziert werden als in denen gesunder Probanden (\*p < 0,05). Die Reaktivität der Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper war in Seren von SSc-Patienten signifikant höher als in Seren gesunder Probanden (\*p < 0,05). Dabei zeigte sich keine Korrelation zwischen der Reaktivität der Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper und den folgenden Patienteneigenschaften: Alter, Geschlecht, Unterform der SSc und Krankheitsdauer. Unter der Hypothese, dass Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper zum Pathomechanismus der SSc beitragen, wurde eine Analyse der Korrelation zwischen der Reaktivität der Antikörper und SSc-assoziierten Krankheitsmanifestationen bzw. der Anzahl an Organmanifestationen durchgeführt. Die Hypothese bestätigte sich nicht. Unerwarteterweise wurde jedoch festgestellt, dass die Reaktivität funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper auch in Seren von Patienten mit MCTD und PM signifikant höher war als in Seren gesunder Probanden. Interessanter war, dass in 49 % der Seren von Patienten mit autoimmunen Lebererkrankungen (23 % stimulierend, 26 % hemmend) und in 70 % der Patienten mit viraler oder toxischer Hepatitis (33 % stimulierend, 37 % hemmend) funktionelle Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper nachgewiesen werden konnten. Insbesondere bei Patienten mit nicht autoimmunen Lebererkrankungen wurden hemmende Antikörper häufiger gefunden als bei SSc-Patienten und gesunden Probanden.

Die Analyse funktioneller Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper in Seren von SSc-Patienten, die im Rahmen der SSc-Therapie eine aHSZT erhalten hatten, ergab, dass eine aHSZT die Prävalenz und die Reaktivität der Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper nur vorübergehend nicht signifikant reduziert. Außerdem konnte keine Korrelation zwischen der Prävalenz oder der Reaktivität der Antikörper und dem klinischen *Outcome* nach aHSZT identifiziert werden.



Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Pathogenese und die klinische Relevanz der Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper für die SSc weiterhin fraglich bleiben. Zusätzlich ist das Vorhandensein von Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern nicht SSc-spezifisch, da die Antikörper auch bei Patienten mit anderen rheumatologischen und chronischen Lebererkrankungen vorkommen. Dies sollte in künftigen Studien mit einem großen Patientenkollektiv untersucht werden. Ferner wird deutlich, dass auch eine therapeutische aHSZT trotz guten *Outcomes* der SSc-Patienten die Prävalenz und die Reaktivität der Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper nur kurzfristig reduziert. Ursächlich dafür könnte eine kurzfristige Reduktion der B-Zellen sein. Weiterführend lässt sich dadurch jedoch auch erklären, dass Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper wahrscheinlich pathogenetisch keine Bedeutung haben.

## LiteraturverzeichnisReferenzen

1. Wollheim, F.A., *Classification of systemic sclerosis. Visions and reality*. Rheumatology (Oxford), 2005. **44**(10): p. 1212-6.
2. LeRoy, E.C. and T.A. Medsger, Jr., *Criteria for the classification of early systemic sclerosis*. J Rheumatol, 2001. **28**(7): p. 1573-6.
3. Bennett, R.M., *Scleroderma overlap syndromes*. Rheum Dis Clin North Am, 1990. **16**(1): p. 185-98.
4. Selye, H., *Die Sklerodermie und ihre Entstehungsweise*. Virchows Arch. path Anat., 1932: p. 91–115.
5. Rodnan, G.P. and T.G. Benedek, *An historical account of the study of progressive systemic sclerosis (diffuse scleroderma)*. Ann Intern Med, 1962. **57**: p. 305-19.
6. Capusan, I., *Curzio's case of scleroderma*. Ann Intern Med, 1972. **76**(1): p. 146.
7. Aringer, M., et al., *[Common German language nomenclature for systemic sclerosis]*, in *Z Rheumatol*. 2015. p. 100-3.
8. LeRoy, E.C., et al., *Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis*. J Rheumatol, 1988. **15**(2): p. 202-5.
9. Hunzelmann, N. and G. Riemekasten, *[Pulmonary arterial hypertension in collagen disease: experiences of the German Network for Systemic Scleroderma]*. Dtsch Med Wochenschr, 2006. **131**(49 Suppl 9): p. S325-7.
10. Masi, A.T., *Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma)*. Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Arthritis Rheum, 1980. **23**(5): p. 581-90.
11. van den Hoogen, F., et al., *2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative*. Arthritis Rheum, 2013. **65**(11): p. 2737-47.
12. Klein-Weigel, P., C. Opitz, and G. Riemekasten, *Systemic sclerosis - a systematic overview: part 1 - disease characteristics and classification, pathophysiologic concepts, and recommendations for diagnosis and surveillance*. Vasa, 2011. **40**(1): p. 6-19.
13. Barnett, A.J., M. Miller, and G.O. Littlejohn, *The diagnosis and classification of scleroderma (systemic sclerosis)*. Postgrad Med J, 1988. **64**(748): p. 121-5.
14. Hunzelmann, N., et al., *The registry of the German Network for Systemic Scleroderma: frequency of disease subsets and patterns of organ involvement*. Rheumatology (Oxford), 2008. **47**(8): p. 1185-92.
15. Moinzadeh, P., et al., *[The German Network for Systemic Scleroderma]*. Hautarzt, 2007. **58**(10): p. 858-63.
16. Mierau, R., et al., *Frequency of disease-associated and other nuclear autoantibodies in patients of the German Network for Systemic*

- Scleroderma: correlation with characteristic clinical features.* Arthritis Res Ther, 2011. **13**(5): p. R172.
17. Alarcon, G.S., *Unclassified or undifferentiated connective tissue disease.* Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol, 2000. **14**(1): p. 125-37.
  18. Hachulla, E. and D. Launay, *Diagnosis and classification of systemic sclerosis.* Clin Rev Allergy Immunol, 2011. **40**(2): p. 78-83.
  19. Poormoghim, H., et al., *Systemic sclerosis sine scleroderma: demographic, clinical, and serologic features and survival in forty-eight patients.* Arthritis Rheum, 2000. **43**(2): p. 444-51.
  20. Arnett, F.C., et al., *Familial occurrence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts.* Arthritis Rheum, 2001. **44**(6): p. 1359-62.
  21. Silman, A., et al., *An epidemiological study of scleroderma in the West Midlands.* Br J Rheumatol, 1988. **27**(4): p. 286-90.
  22. Maricq, H.R., et al., *Prevalence of scleroderma spectrum disorders in the general population of South Carolina.* Arthritis Rheum, 1989. **32**(8): p. 998-1006.
  23. Steen, V.D., et al., *Incidence of systemic sclerosis in Allegheny County, Pennsylvania. A twenty-year study of hospital-diagnosed cases, 1963-1982.* Arthritis Rheum, 1997. **40**(3): p. 441-5.
  24. Tamaki, T., S. Mori, and K. Takehara, *Epidemiological study of patients with systemic sclerosis in Tokyo.* Arch Dermatol Res, 1991. **283**(6): p. 366-71.
  25. 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.
  26. Martin, J.E., L. Bossini-Castillo, and J. Martin, *Unraveling the genetic component of systemic sclerosis.* Hum Genet, 2012. **131**(7): p. 1023-37.
  27. Arnett, F.C., et al., *Major histocompatibility complex (MHC) class II alleles, haplotypes and epitopes which confer susceptibility or protection in systemic sclerosis: analyses in 1300 Caucasian, African-American and Hispanic cases and 1000 controls.* Ann Rheum Dis, 2010. **69**(5): p. 822-7.
  28. Simeon, C.P., et al., *Association of HLA class II genes with systemic sclerosis in Spanish patients.* J Rheumatol, 2009. **36**(12): p. 2733-6.
  29. Kuwana, M., et al., *Association of human leukocyte antigen class II genes with autoantibody profiles, but not with disease susceptibility in Japanese patients with systemic sclerosis.* Intern Med, 1999. **38**(4): p. 336-44.
  30. Gilchrist, F.C., et al., *Class II HLA associations with autoantibodies in scleroderma: a highly significant role for HLA-DP.* Genes Immun, 2001. **2**(2): p. 76-81.
  31. Chizzolini, C., *Update on pathophysiology of scleroderma with special reference to immunoinflammatory events.* Ann Med, 2007. **39**(1): p. 42-53.
  32. Eckes, B., et al., *Scleroderma -- news to tell.* Arch Dermatol Res, 2007. **299**(3): p. 139-44.

33. Fabri, M. and T. Krieg, [*Pathogenesis of systemic sclerosis*]. *Hautarzt*, 2007. **58**(10): p. 838, 840-3.
34. Silveri, F., et al., *Relative roles of endothelial cell damage and platelet activation in primary Raynaud's phenomenon (RP) and RP secondary to systemic sclerosis*. *Scand J Rheumatol*, 2001. **30**(5): p. 290-6.
35. Distler, O., et al., *Uncontrolled expression of vascular endothelial growth factor and its receptors leads to insufficient skin angiogenesis in patients with systemic sclerosis*. *Circ Res*, 2004. **95**(1): p. 109-16.
36. Kahaleh, M.B., *Raynaud phenomenon and the vascular disease in scleroderma*. *Curr Opin Rheumatol*, 2004. **16**(6): p. 718-22.
37. Prescott, R.J., et al., *Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma*. *J Pathol*, 1992. **166**(3): p. 255-63.
38. Scharffetter, K., B. Lankat-Buttgereit, and T. Krieg, *Localization of collagen mRNA in normal and scleroderma skin by in-situ hybridization*. *Eur J Clin Invest*, 1988. **18**(1): p. 9-17.
39. Kahari, V.M., et al., *Identification of fibroblasts responsible for increased collagen production in localized scleroderma by in situ hybridization*. *J Invest Dermatol*, 1988. **90**(5): p. 664-70.
40. Ferrarini, M., et al., *Functional and phenotypic analysis of T lymphocytes cloned from the skin of patients with systemic sclerosis*. *Clin Exp Immunol*, 1990. **79**(3): p. 346-52.
41. Gruschwitz, M.S. and G. Vieth, *Up-regulation of class II major histocompatibility complex and intercellular adhesion molecule 1 expression on scleroderma fibroblasts and endothelial cells by interferon-gamma and tumor necrosis factor alpha in the early disease stage*. *Arthritis Rheum*, 1997. **40**(3): p. 540-50.
42. Mavalia, C., et al., *Type 2 helper T-cell predominance and high CD30 expression in systemic sclerosis*. *Am J Pathol*, 1997. **151**(6): p. 1751-8.
43. Salmon-Ehr, V., et al., *Expression of interleukin-4 in scleroderma skin specimens and scleroderma fibroblast cultures. Potential role in fibrosis*. *Arch Dermatol*, 1996. **132**(7): p. 802-6.
44. Luzina, I.G., et al., *Gene expression in bronchoalveolar lavage cells from scleroderma patients*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002. **26**(5): p. 549-57.
45. Scaletti, C., et al., *Th2-oriented profile of male offspring T cells present in women with systemic sclerosis and reactive with maternal major histocompatibility complex antigens*. *Arthritis Rheum*, 2002. **46**(2): p. 445-50.
46. Yoshizaki, A., *Pathogenic roles of B lymphocytes in systemic sclerosis*. *Immunol Lett*, 2018. **195**: p. 76-82.
47. Tedder, T.F., et al., *The CD19-CD21 signal transduction complex of B lymphocytes regulates the balance between health and autoimmune disease: systemic sclerosis as a model system*. *Curr Dir Autoimmun*, 2005. **8**: p. 55-90.
48. Matsushita, T., et al., *Elevated serum BAFF levels in patients with systemic sclerosis: enhanced BAFF signaling in systemic sclerosis B lymphocytes*. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(1): p. 192-201.

49. Sato, S., et al., *Quantitative genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity*. J Immunol, 2000. **165**(11): p. 6635-43.
50. Sato, S., et al., *Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(6): p. 1918-27.
51. Snapper, C.M., et al., *Transforming growth factor-beta 1 is required for secretion of IgG of all subclasses by LPS-activated murine B cells in vitro*. J Immunol, 1993. **151**(9): p. 4625-36.
52. Onishi, A., et al., *Cancer incidence in systemic sclerosis: meta-analysis of population-based cohort studies*. Arthritis Rheum, 2013. **65**(7): p. 1913-21.
53. Knoop, H., et al., *[Lung impairment in systemic sclerosis]*. Pneumologie, 2009. **63**(9): p. 497-507.
54. Steen, V.D. and T.A. Medsger, *Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972-2002*. Ann Rheum Dis, 2007. **66**(7): p. 940-4.
55. Khanna, D., et al., *Predictors of lung function decline in scleroderma-related interstitial lung disease based on high-resolution computed tomography: implications for cohort enrichment in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease trials*. Arthritis Res Ther, 2015. **17**: p. 372.
56. Denton, C.P. and D. Khanna, *Systemic sclerosis*. Lancet, 2017. **390**(10103): p. 1685-1699.
57. Steen, V.D., *Autoantibodies in systemic sclerosis*. Semin Arthritis Rheum, 2005. **35**(1): p. 35-42.
58. Hachulla, E., et al., *Early detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: a French nationwide prospective multicenter study*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(12): p. 3792-800.
59. Hoeper, M.M., et al., *[Diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: European guidelines 2009]*. Pneumologie, 2010. **64**(7): p. 401-14.
60. Steen, V. and T.A. Medsger, Jr., *Predictors of isolated pulmonary hypertension in patients with systemic sclerosis and limited cutaneous involvement*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(2): p. 516-22.
61. Kawut, S.M., et al., *Hemodynamics and survival in patients with pulmonary arterial hypertension related to systemic sclerosis*. Chest, 2003. **123**(2): p. 344-50.
62. Persa, O.D., P. Moinzadeh, and N. Hunzelmann, *[Systemic sclerosis. Current classification and diagnosis of organ involvement]*. Hautarzt, 2015. **66**(8): p. 599-603.
63. Penn, H., et al., *Scleroderma renal crisis: patient characteristics and long-term outcomes*. QJM, 2007. **100**(8): p. 485-94.
64. Traub, Y.M., et al., *Hypertension and renal failure (scleroderma renal crisis) in progressive systemic sclerosis. Review of a 25-year experience with 68 cases*. Medicine (Baltimore), 1983. **62**(6): p. 335-52.
65. Steen, V., *Scleroderma renal crisis*. Indian J Med Sci, 2007. **61**(2): p. 71-2.

66. Steen, V.D., et al., *Outcome of renal crisis in systemic sclerosis: relation to availability of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors*. Ann Intern Med, 1990. **113**(5): p. 352-7.
67. Kreuter, A., et al., *German guidelines for the diagnosis and therapy of localized scleroderma*. J Dtsch Dermatol Ges, 2016. **14**(2): p. 199-216.
68. Shanmugam, V.K. and V.D. Steen, *Renal disease in scleroderma: an update on evaluation, risk stratification, pathogenesis and management*. Curr Opin Rheumatol, 2012. **24**(6): p. 669-76.
69. Derk, C.T. and S.A. Jimenez, *Goodpasture-like syndrome induced by D-penicillamine in a patient with systemic sclerosis: report and review of the literature*. J Rheumatol, 2003. **30**(7): p. 1616-20.
70. Steen, V.D., M.D. Mayes, and P.A. Merkel, *Assessment of kidney involvement*. Clin Exp Rheumatol, 2003. **21**(3 Suppl 29): p. S29-31.
71. Hunzelmann, N., et al., *[Organ-specific diagnosis in patients with systemic sclerosis: Recommendations of the German Network for Systemic Sclerosis (DNSS)]*. Z Rheumatol, 2008. **67**(4): p. 334-6, 337-40.
72. Champion, H.C., *The heart in scleroderma*. Rheum Dis Clin North Am, 2008. **34**(1): p. 181-90; viii.
73. Marie, I., *[Gastrointestinal involvement in systemic sclerosis]*. Presse Med, 2006. **35**(12 Pt 2): p. 1952-65.
74. Ponge, T. and S. Bruley des Varannes, *[Digestive involvement of scleroderma]*. Rev Prat, 2002. **52**(17): p. 1896-900.
75. McFarlane, I.M., et al., *Gastrointestinal Manifestations of Systemic Sclerosis*. Rheumatology (Sunnyvale), 2018. **8**(1).
76. Sjogren, R.W., *Gastrointestinal motility disorders in scleroderma*. Arthritis Rheum, 1994. **37**(9): p. 1265-82.
77. Franck-Larsson, K., W. Graf, and A. Ronnblom, *Lower gastrointestinal symptoms and quality of life in patients with systemic sclerosis: a population-based study*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2009. **21**(2): p. 176-82.
78. Perez Aisa, A., et al., *Small intestinal bacterial overgrowth is common after gastrectomy but with little impact on nutritional status*. Gastroenterol Hepatol, 2019. **42**(1): p. 1-10.
79. Sunderkotter, C. and G. Riemekasten, *[Raynaud phenomenon in dermatology. Part 1: Pathophysiology and diagnostic approach]*. Hautarzt, 2006. **57**(9): p. 819-28; quiz 829.
80. Rodnan, G.P., R.L. Myerowitz, and G.O. Justh, *Morphologic changes in the digital arteries of patients with progressive systemic sclerosis (scleroderma) and Raynaud phenomenon*. Medicine (Baltimore), 1980. **59**(6): p. 393-408.
81. Steen, V.D. and T.A. Medsger, Jr., *Severe organ involvement in systemic sclerosis with diffuse scleroderma*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(11): p. 2437-44.
82. Van Praet, J.T., et al., *Histopathological cutaneous alterations in systemic sclerosis: a clinicopathological study*. Arthritis Res Ther, 2011. **13**(1): p. R35.

83. Morrisroe, K.B., M. Nikpour, and S.M. Proudman, *Musculoskeletal Manifestations of Systemic Sclerosis*. Rheum Dis Clin North Am, 2015. **41**(3): p. 507-18.
84. Walker, U.A., et al., *Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials And Research group database*. Ann Rheum Dis, 2007. **66**(6): p. 754-63.
85. Ho, K.T. and J.D. Reveille, *The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma*. Arthritis Res Ther, 2003. **5**(2): p. 80-93.
86. Herold, G.u.M., *Innere Medizin*. Progressive Systemische Sklerose (PSS). 2019: Herold. 1002.
87. Reveille, J.D., D.H. Solomon, and G. American College of Rheumatology Ad Hoc Committee of Immunologic Testing, *Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: anticentromere, Scl-70, and nucleolar antibodies*. Arthritis Rheum, 2003. **49**(3): p. 399-412.
88. Mehra, S., et al., *Autoantibodies in systemic sclerosis*. Autoimmun Rev, 2013. **12**(3): p. 340-54.
89. Steen, V.D., *Autoantibodies in systemic sclerosis*. Bull Rheum Dis, 1996. **45**(6): p. 6-8.
90. Murata, I., et al., *Diversity of myocardial involvement in systemic sclerosis: an 8-year study of 95 Japanese patients*. Am Heart J, 1998. **135**(6 Pt 1): p. 960-9.
91. Meyer, O., et al., *Anti-RNA polymerase III antibody prevalence and associated clinical manifestations in a large series of French patients with systemic sclerosis: a cross-sectional study*. J Rheumatol, 2010. **37**(1): p. 125-30.
92. Arnett, F.C., et al., *Autoantibodies to fibrillarin in systemic sclerosis (scleroderma). An immunogenetic, serologic, and clinical analysis*. Arthritis Rheum, 1996. **39**(7): p. 1151-60.
93. Tormey, V.J., et al., *Anti-fibrillarin antibodies in systemic sclerosis*. Rheumatology (Oxford), 2001. **40**(10): p. 1157-62.
94. Aggarwal, R., et al., *Anti-U3 RNP autoantibodies in systemic sclerosis*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(4): p. 1112-8.
95. Reveille, J.D., et al., *Systemic sclerosis in 3 US ethnic groups: a comparison of clinical, sociodemographic, serologic, and immunogenetic determinants*. Semin Arthritis Rheum, 2001. **30**(5): p. 332-46.
96. Benito-Garcia, E., et al., *Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: anti-Sm and anti-RNP antibody tests*. Arthritis Rheum, 2004. **51**(6): p. 1030-44.
97. *Antikörper gegen U1 (RNP70kDA,RNP-A,RNP-C) (ANA Profil Immunoblot)*. 2017 [cited 2020 12.4.20]; Available from: [https://www.uniklinik-ulm.de/fileadmin/default/09\\_Sonstige/Klinische-Chemie/Seiteninhalte/Seiteninhalte\\_U/U1\\_RNP-AK.pdf](https://www.uniklinik-ulm.de/fileadmin/default/09_Sonstige/Klinische-Chemie/Seiteninhalte/Seiteninhalte_U/U1_RNP-AK.pdf).
98. *PMScI-Antikörper (ANA Profil Immunoblot)*. 2017 [cited 2020 14.04.20]; Available from: [https://www.uniklinik-ulm.de/fileadmin/default/09\\_Sonstige/Klinische-Chemie/Seiteninhalte/Seiteninhalte\\_P/PMScI-Antikoerper.pdf](https://www.uniklinik-ulm.de/fileadmin/default/09_Sonstige/Klinische-Chemie/Seiteninhalte/Seiteninhalte_P/PMScI-Antikoerper.pdf).

99. Vandergheynst, F., et al., *Anti-pm/scl antibodies in connective tissue disease: Clinical and biological assessment of 14 patients*. Clin Exp Rheumatol, 2006. **24**(2): p. 129-33.
100. Stochmal, A., et al., *Antinuclear Antibodies in Systemic Sclerosis: an Update*. Clin Rev Allergy Immunol, 2020. **58**(1): p. 40-51.
101. Berger, M. and V.D. Steen, *Role of anti-receptor autoantibodies in pathophysiology of scleroderma*. Autoimmun Rev, 2017. **16**(10): p. 1029-1035.
102. Wallukat, G. and I. Schimke, *Agonistic autoantibodies directed against G-protein-coupled receptors and their relationship to cardiovascular diseases*. Semin Immunopathol, 2014. **36**(3): p. 351-63.
103. Kill, A. and G. Riemekasten, *Functional autoantibodies in systemic sclerosis pathogenesis*. Curr Rheumatol Rep, 2015. **17**(5): p. 34.
104. Baroni, S.S., et al., *Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis*. N Engl J Med, 2006. **354**(25): p. 2667-76.
105. Gabrielli, A., et al., *Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor: a link to fibrosis in scleroderma and a pathway for novel therapeutic targets*. Autoimmun Rev, 2007. **7**(2): p. 121-6.
106. Kawaguchi, Y., et al., *Muscarinic-3 acetylcholine receptor autoantibody in patients with systemic sclerosis: contribution to severe gastrointestinal tract dysmotility*. Ann Rheum Dis, 2009. **68**(5): p. 710-4.
107. Eaker, E.Y., et al., *Myenteric neuronal antibodies in scleroderma: passive transfer evokes alterations in intestinal myoelectric activity in a rat model*. J Lab Clin Med, 1999. **133**(6): p. 551-6.
108. Goldblatt, F., T.P. Gordon, and S.A. Waterman, *Antibody-mediated gastrointestinal dysmotility in scleroderma*. Gastroenterology, 2002. **123**(4): p. 1144-50.
109. Hebbar, M., et al., *Assessment of anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis and Sjogren's syndrome*. Ann Rheum Dis, 1997. **56**(4): p. 230-4.
110. Renaudineau, Y., et al., *Anti-endothelial cell antibodies (AECA) in systemic sclerosis--increased sensitivity using different endothelial cell substrates and association with other autoantibodies*. Autoimmunity, 2001. **33**(3): p. 171-9.
111. Carvalho, D., et al., *IgG antiendothelial cell autoantibodies from scleroderma patients induce leukocyte adhesion to human vascular endothelial cells in vitro. Induction of adhesion molecule expression and involvement of endothelium-derived cytokines*. J Clin Invest, 1996. **97**(1): p. 111-9.
112. Sgonc, R., et al., *Endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis is induced by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity via CD95*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(11): p. 2550-62.
113. Ahmed, S.S., et al., *Induction of apoptosis and fibrillin 1 expression in human dermal endothelial cells by scleroderma sera containing anti-endothelial cell antibodies*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(7): p. 2250-62.
114. Wolf, S.I., et al., *Agonistic anti-ICAM-1 antibodies in scleroderma: activation of endothelial pro-inflammatory cascades*. Vascul Pharmacol, 2013. **59**(1-2): p. 19-26.



115. Kill, A., et al., *Autoantibodies to angiotensin and endothelin receptors in systemic sclerosis induce cellular and systemic events associated with disease pathogenesis*. *Arthritis Res Ther*, 2014. **16**(1): p. R29.
116. Rabquer, B.J., et al., *The proadhesive phenotype of systemic sclerosis skin promotes myeloid cell adhesion via ICAM-1 and VCAM-1*. *Rheumatology (Oxford)*, 2009. **48**(7): p. 734-40.
117. Riemekasten, G., et al., *Involvement of functional autoantibodies against vascular receptors in systemic sclerosis*. *Ann Rheum Dis*, 2011. **70**(3): p. 530-6.
118. Blobel, G.A., W.P. Schiemann, and H.F. Lodish, *Role of transforming growth factor beta in human disease*. *N Engl J Med*, 2000. **342**(18): p. 1350-8.
119. Gunther, J., et al., *Angiotensin receptor type 1 and endothelin receptor type A on immune cells mediate migration and the expression of IL-8 and CCL18 when stimulated by autoantibodies from systemic sclerosis patients*. *Arthritis Res Ther*, 2014. **16**(2): p. R65.
120. Attar, R., K. Harvey, and R.A. Siddiqui, *Interleukin-8: An autocrine inflammatory mediator*. *Curr Pharm Des*, 1999. **5**(4): p. 241-53.
121. Reitamo, S., et al., *Demonstration of interleukin 8 and autoantibodies to interleukin 8 in the serum of patients with systemic sclerosis and related disorders*. *Arch Dermatol*, 1993. **129**(2): p. 189-93.
122. Kawaguchi, Y., et al., *Angiotensin II in the lesional skin of systemic sclerosis patients contributes to tissue fibrosis via angiotensin II type 1 receptors*. *Arthritis Rheum*, 2004. **50**(1): p. 216-26.
123. Yamane, K., et al., *Significance of plasma endothelin-1 levels in patients with systemic sclerosis*. *J Rheumatol*, 1992. **19**(10): p. 1566-71.
124. Becker, M.O., et al., *Vascular receptor autoantibodies in pulmonary arterial hypertension associated with systemic sclerosis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014. **190**(7): p. 808-17.
125. Cabral-Marques, O. and G. Riemekasten, *Vascular hypothesis revisited: Role of stimulating antibodies against angiotensin and endothelin receptors in the pathogenesis of systemic sclerosis*. *Autoimmun Rev*, 2016. **15**(7): p. 690-4.
126. Avouac, J., et al., *Autoantibodies against Endothelin 1 Type A Receptor Are Strong Predictors of Digital Ulcers in Systemic Sclerosis*. *J Rheumatol*, 2015. **42**(10): p. 1801-7.
127. Denton, C.P., et al., *Long-term effects of bosentan on quality of life, survival, safety and tolerability in pulmonary arterial hypertension related to connective tissue diseases*. *Ann Rheum Dis*, 2008. **67**(9): p. 1222-8.
128. Xiong, J., et al., *The role of angiotensin II type 1 receptor-activating antibodies in patients with lupus nephritis*. *Int J Clin Pract*, 2013. **67**(10): p. 1066-7.
129. Guo, L., et al., *Anti-Endothelin Receptor Type A Autoantibodies in Systemic Lupus Erythematosus-Associated Pulmonary Arterial Hypertension*. *Arthritis Rheumatol*, 2015. **67**(9): p. 2394-402.
130. Hachulla, E., et al., *Risk factors for death and the 3-year survival of patients with systemic sclerosis: the French ItinerAIR-Sclerodermie study*. *Rheumatology (Oxford)*, 2009. **48**(3): p. 304-8.

131. Domsic, R.T., et al., *Skin thickness progression rate: a predictor of mortality and early internal organ involvement in diffuse scleroderma*. Ann Rheum Dis, 2011. **70**(1): p. 104-9.
132. Khanna, D., et al., *Standardization of the modified Rodnan skin score for use in clinical trials of systemic sclerosis*. J Scleroderma Relat Disord, 2017. **2**(1): p. 11-18.
133. Rossi, D., et al., *The role of nail-videocapillaroscopy in early diagnosis of scleroderma*. Autoimmun Rev, 2013. **12**(8): p. 821-5.
134. Riemekasten, G., *[Progress in Systemic Sclerosis - Early, Targeted and Intensive Therapy is the Key to Success]*. Dtsch Med Wochenschr, 2019. **144**(3): p. 189-193.
135. British Cardiac Society, G., et al., *Recommendations on the management of pulmonary hypertension in clinical practice*. Heart, 2001. **86 Suppl 1**: p. I1-13.
136. Kowal-Bielecka, O., et al., *Update of EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis*. Ann Rheum Dis, 2017. **76**(8): p. 1327-1339.
137. Pakas, I., et al., *Cyclophosphamide with low or high dose prednisolone for systemic sclerosis lung disease*. J Rheumatol, 2002. **29**(2): p. 298-304.
138. Kowal-Bielecka, O., et al., *EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group (EUSTAR)*. Ann Rheum Dis, 2009. **68**(5): p. 620-8.
139. van den Hoogen, F.H., et al., *Comparison of methotrexate with placebo in the treatment of systemic sclerosis: a 24 week randomized double-blind trial, followed by a 24 week observational trial*. Br J Rheumatol, 1996. **35**(4): p. 364-72.
140. Pope, J.E., et al., *A randomized, controlled trial of methotrexate versus placebo in early diffuse scleroderma*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(6): p. 1351-8.
141. Thompson, A.E., et al., *Calcium-channel blockers for Raynaud's phenomenon in systemic sclerosis*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(8): p. 1841-7.
142. Roustit, M., et al., *Phosphodiesterase-5 inhibitors for the treatment of secondary Raynaud's phenomenon: systematic review and meta-analysis of randomised trials*. Ann Rheum Dis, 2013. **72**(10): p. 1696-9.
143. Herrick, A.L., et al., *Modified-release sildenafil reduces Raynaud's phenomenon attack frequency in limited cutaneous systemic sclerosis*. Arthritis Rheum, 2011. **63**(3): p. 775-82.
144. Pope, J., et al., *Iloprost and cisaprost for Raynaud's phenomenon in progressive systemic sclerosis*. Cochrane Database Syst Rev, 2000(2): p. CD000953.
145. Korn, J.H., et al., *Digital ulcers in systemic sclerosis: prevention by treatment with bosentan, an oral endothelin receptor antagonist*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(12): p. 3985-93.
146. Galie, N., et al., *2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European*

- Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). Eur Heart J, 2016. 37(1): p. 67-119.*
147. Ghofrani, H.A., et al., *Treatment of pulmonary arterial hypertension (PAH): updated Recommendations of the Cologne Consensus Conference 2011. Int J Cardiol, 2011. 154 Suppl 1: p. S20-33.*
  148. Pakozdi, A., et al., *Does long term therapy with lansoprazole slow progression of oesophageal involvement in systemic sclerosis? Clin Exp Rheumatol, 2009. 27(3 Suppl 54): p. 5-8.*
  149. Chiba, N., et al., *Speed of healing and symptom relief in grade II to IV gastroesophageal reflux disease: a meta-analysis. Gastroenterology, 1997. 112(6): p. 1798-810.*
  150. Kishimoto, Y., et al., *Transfer of autoimmune thyroiditis and resolution of palmoplantar pustular psoriasis following allogeneic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant, 1997. 19(10): p. 1041-3.*
  151. Meloni, G., et al., *Blast crisis of chronic myelogenous leukemia in long-lasting systemic lupus erythematosus: regression of both diseases after autologous bone marrow transplantation. Blood, 1997. 89(12): p. 4659.*
  152. Joske, D.J., et al., *Autologous bone-marrow transplantation for rheumatoid arthritis. Lancet, 1997. 350(9074): p. 337-8.*
  153. Tyndall, A., J. Passweg, and A. Gratwohl, *Haemopoietic stem cell transplantation in the treatment of severe autoimmune diseases 2000. Ann Rheum Dis, 2001. 60(7): p. 702-7.*
  154. Walker, U.A., L.A. Saketkoo, and O. Distler, *Haematopoietic stem cell transplantation in systemic sclerosis. RMD Open, 2018. 4(1): p. e000533.*
  155. Henes, J.C., et al., *Optimization of autologous stem cell transplantation for systemic sclerosis -- a single-center longterm experience in 26 patients with severe organ manifestations. J Rheumatol, 2012. 39(2): p. 269-75.*
  156. Henes, J.C., S. Wirths, and I. Kotter, *[Autologous stem cell transplantation in systemic sclerosis]. Z Rheumatol, 2016. 75(8): p. 762-769.*
  157. Burt, R.K., et al., *The rationale behind autologous autoimmune hematopoietic stem cell transplant conditioning regimens: concerns over the use of total-body irradiation in systemic sclerosis. Bone Marrow Transplant, 2004. 34(9): p. 745-51.*
  158. Oyama, Y., et al., *Autologous non-myeloablative hematopoietic stem cell transplantation in patients with systemic sclerosis. Bone Marrow Transplant, 2007. 40(6): p. 549-55.*
  159. Farge, D., et al., *Autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases: an observational study on 12 years' experience from the European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party on Autoimmune Diseases. Haematologica, 2010. 95(2): p. 284-92.*
  160. Elhai, M., et al., *Mapping and predicting mortality from systemic sclerosis. Ann Rheum Dis, 2017. 76(11): p. 1897-1905.*

161. 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.
162. Becker, M.O. and G. Riemekasten, *Risk factors for severity and manifestations in systemic sclerosis and prediction of disease course*. *Expert Rev Clin Immunol*, 2016. **12**(2): p. 115-35.
163. Chung, O., et al., *Physiological and pharmacological implications of AT1 versus AT2 receptors*. *Kidney Int Suppl*, 1998. **67**: p. S95-9.
164. Tufro-McReddie, A., et al., *Angiotensin II regulates nephrogenesis and renal vascular development*. *Am J Physiol*, 1995. **269**(1 Pt 2): p. F110-5.
165. Bergsma, D.J., et al., *Cloning and characterization of a human angiotensin II type 1 receptor*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. **183**(3): p. 989-95.
166. Kawahara, Y., et al., *Angiotensin II induces expression of the c-fos gene through protein kinase C activation and calcium ion mobilization in cultured vascular smooth muscle cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988. **150**(1): p. 52-9.
167. Pándy-Szekeres G, M.C., Tsonkov TM, Mordalski S, Harpsøe K, Hauser AS, Bojarski AJ, Gloriam DE. *GPCRdb in 2018: adding GPCR structure models and ligands*. *Nucleic Acids Research* 2018; Available from: <https://gpcrdb.org>.
168. Michelini, E., et al., *Cell-based assays: fuelling drug discovery*. *Anal Bioanal Chem*, 2010. **398**(1): p. 227-38.
169. Rabinovitch, P.S. and J.P. Robinson, *Overview of functional cell assays*. *Curr Protoc Cytom*, 2002. **Chapter 9**: p. Unit 9 1.
170. Doronin, A.N., et al., *T-Cell Engagers Based Bioassay for Evaluation of PD-1/PD-L1 Inhibitors Activity*. *Biochemistry (Mosc)*, 2019. **84**(7): p. 711-719.
171. Preuss, B., et al., *A novel luminescence-based method for the detection of functionally active antibodies to muscarinic acetylcholine receptors of the M3 type (mAChR3) in patients' sera*. *Clin Exp Immunol*, 2014. **177**(1): p. 179-89.
172. Baubet, V., et al., *Chimeric green fluorescent protein-aequorin as bioluminescent Ca<sup>2+</sup> reporters at the single-cell level*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(13): p. 7260-5.
173. Rouillard, A.D., et al., *The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins*. *Database (Oxford)*, 2016. **2016**.
174. Nakabayashi, H., et al., *Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium*. *Cancer Res*, 1982. **42**(9): p. 3858-63.
175. Bankamp, L., et al., *Functionally Active Antibodies to the Angiotensin II Type 1-Receptor Measured by a Luminometric Bioassay Do Not Correlate With Clinical Manifestations in Systemic Sclerosis: A Comparison With Antibodies to Vascular Receptors and Topoisomerase I Detected by ELISA*. *Front Immunol*, 2021. **12**: p. 786039.

176. Leanos-Miranda, A., et al., *Stimulating autoantibodies against the angiotensin II type 1 receptor are not associated with preeclampsia in Mexican-Mestizo women*. J Hypertens, 2010. **28**(4): p. 834-41.
177. Zheng, Y., Y.C. Fang, and J. Li, *PD-L1 expression levels on tumor cells affect their immunosuppressive activity*. Oncol Lett, 2019. **18**(5): p. 5399-5407.
178. Grubbs, F.E., *Sample Criteria for Testing Outlying Observations*. The Annals of Mathematical Statistics, 1950. **21**(1): p. 27-58.
179. Dechend, R., et al., *AT1 receptor agonistic antibodies, hypertension, and preeclampsia*. Semin Nephrol, 2004. **24**(6): p. 571-9.
180. Guo, D.F., et al., *The angiotensin II type 1 receptor and receptor-associated proteins*. Cell Res, 2001. **11**(3): p. 165-80.
181. Consortium, T.U., *UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021*. Nucleic Acids Research, 2020. **49**(D1): p. D480-D489.
182. Bankamp, L., et al., *Functional autoantibodies in systemic sclerosis: influence of autologous stem cell transplantation and correlation with clinical outcome*. Rheumatology (Oxford), 2023. **62**(6): p. 2168-2177.
183. Dragan, D., et al., *Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection*. N Engl J Med, 2005. **352**(6): p. 558-69.
184. Wallukat, G., et al., *Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor*. J Clin Invest, 1999. **103**(7): p. 945-52.
185. Fu, M.L., et al., *Autoantibodies against the angiotensin receptor (AT1) in patients with hypertension*. J Hypertens, 2000. **18**(7): p. 945-53.
186. Giil, L.M., et al., *Autoantibodies Toward the Angiotensin 2 Type 1 Receptor: A Novel Autoantibody in Alzheimer's Disease*. J Alzheimers Dis, 2015. **47**(2): p. 523-9.
187. Li, H., et al., *Prevalence of angiotensin II type 1 receptor (AT1R)-activating autoantibodies in primary aldosteronism*. J Am Soc Hypertens, 2015. **9**(1): p. 15-20.
188. Shimomura, O., F.H. Johnson, and Y. Saiga, *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea*. J Cell Comp Physiol, 1962. **59**: p. 223-39.
189. Shimomura, O., *Luminescence of aequorin is triggered by the binding of two calcium ions*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **211**(2): p. 359-63.
190. Sandberg, K., et al., *Calcium mobilization by angiotensin II and neurotransmitter receptors expressed in Xenopus laevis oocytes*. FEBS Lett, 1988. **241**(1-2): p. 177-80.
191. Button, D. and M. Brownstein, *Aequorin-expressing mammalian cell lines used to report Ca<sup>2+</sup> mobilization*. Cell Calcium, 1993. **14**(9): p. 663-71.
192. Ungrin, M.D., et al., *An automated aequorin luminescence-based functional calcium assay for G-protein-coupled receptors*. Anal Biochem, 1999. **272**(1): p. 34-42.
193. Shimomura, O., B. Musicki, and Y. Kishi, *Semi-synthetic aequorins with improved sensitivity to Ca<sup>2+</sup> ions*. Biochem J, 1989. **261**(3): p. 913-20.
194. Gould, S.J. and S. Subramani, *Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology*. Anal Biochem, 1988. **175**(1): p. 5-13.

195. Lam, R., et al., *Validating parameters of a luciferase reporter gene assay to measure neutralizing antibodies to IFNbeta in multiple sclerosis patients*. J Immunol Methods, 2008. **336**(2): p. 113-8.
196. Xu, S., et al., *NFATc1 is a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma and induces tumor cell apoptosis by activating the FasL-mediated extrinsic signaling pathway*. Cancer Med, 2018. **7**(9): p. 4701-4717.
197. Hook, B.a.L., A. *Choosing the Right Transfection Reagent for Optimal Efficiency*. 2006 November 2018 13.10.2021]; Available from: <https://www.promega.de/resources/pubhub/tpub-205-choosing-the-right-transfection-reagent-for-optimal-efficiency/>.
198. Papatheodorou, I., et al., *Expression Atlas update: from tissues to single cells*. Nucleic Acids Res, 2020. **48**(D1): p. D77-D83.
199. Egorina, E.M., M.A. Sovershaev, and B. Osterud, *In-cell Western assay: a new approach to visualize tissue factor in human monocytes*. J Thromb Haemost, 2006. **4**(3): p. 614-20.
200. Iannarone, V.J., et al., *The answer depends on the question: Optimal conditions for western blot characterization of muscle collagen type 1 depends on desired isoform*. J Biol Methods, 2019. **6**(3): p. e117.
201. Ilgen, U., M.E. Yayla, and N. Duzgun, *Anti-angiotensin II type 1 receptor autoantibodies (AT1R-AAs) in patients with systemic sclerosis: lack of association with disease manifestations*. Rheumatol Int, 2017. **37**(4): p. 593-598.
202. Gunther, J., et al., *Functional autoantibodies in systemic sclerosis*. Semin Immunopathol, 2015. **37**(5): p. 529-42.
203. Tamm, M., et al., *Autologous haemopoietic stem cell transplantation in a patient with severe pulmonary hypertension complicating connective tissue disease*. Ann Rheum Dis, 1996. **55**(10): p. 779-80.
204. Farge, D., et al., *Autologous stem cell transplantation in the treatment of systemic sclerosis: report from the EBMT/EULAR Registry*. Ann Rheum Dis, 2004. **63**(8): p. 974-81.
205. Farge, D., et al., *Autologous bone marrow transplantation in the treatment of refractory systemic sclerosis: early results from a French multicentre phase I-II study*. Br J Haematol, 2002. **119**(3): p. 726-39.
206. Nash, R.A., et al., *High-dose immunosuppressive therapy and autologous hematopoietic cell transplantation for severe systemic sclerosis: long-term follow-up of the US multicenter pilot study*. Blood, 2007. **110**(4): p. 1388-96.
207. Henes, J., et al., *Analysis of anti-topoisomerase I antibodies in patients with systemic sclerosis before and after autologous stem cell transplantation*. Rheumatology (Oxford), 2017. **56**(3): p. 451-456.
208. Song, L., et al., *Serum agonistic autoantibodies against type-1 angiotensin II receptor titer in patients with epithelial ovarian cancer: a potential role in tumor cell migration and angiogenesis*. J Ovarian Res, 2013. **6**(1): p. 22.
209. Zhao, L., C. Xu, and J. Xu, *Autoantibodies against beta1 receptor and AT1 receptor in type 2 diabetes patients with left ventricular dilatation*. Cardiology, 2014. **129**(3): p. 191-6.

210. Xu, J., et al., *Relationship between autoantibody to the angiotensin II-1 receptor and cardiovascular manifestations of Graves' disease*. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2014. **122**(4): p. 254-8.
211. Klein-Weigel, P.F., et al., *G-protein coupled receptor auto-antibodies in thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) and their removal by immunoabsorption*. *Vasa*, 2014. **43**(5): p. 347-52.
212. Budding, K., et al., *Anti-ETAR and anti-AT1R autoantibodies are elevated in patients with endstage cystic fibrosis*. *J Cyst Fibros*, 2015. **14**(1): p. 42-5.
213. Cohen, I.R. and D.B. Young, *Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus*. *Immunol Today*, 1991. **12**(4): p. 105-10.
214. Madi, A., et al., *The natural autoantibody repertoire in newborns and adults: a current overview*. *Adv Exp Med Biol*, 2012. **750**: p. 198-212.
215. Silverman, G.J., J. Vas, and C. Gronwall, *Protective autoantibodies in the rheumatic diseases: lessons for therapy*. *Nat Rev Rheumatol*, 2013. **9**(5): p. 291-300.
216. Riemekasten, G., F. Petersen, and H. Heidecke, *What Makes Antibodies Against G Protein-Coupled Receptors so Special? A Novel Concept to Understand Chronic Diseases*. *Frontiers in Immunology*, 2020. **11**(3256).
217. Yoshiji, H., et al., *Angiotensin-II and vascular endothelial growth factor interaction plays an important role in rat liver fibrosis development*. *Hepatol Res*, 2006. **36**(2): p. 124-9.
218. Bataller, R., et al., *Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells*. *Gastroenterology*, 2000. **118**(6): p. 1149-56.
219. Ohe, H., et al., *Association of anti-human leukocyte antigen and anti-angiotensin II type 1 receptor antibodies with liver allograft fibrosis after immunosuppression withdrawal*. *Transplantation*, 2014. **98**(10): p. 1105-11.
220. Bouhlal, H. and S. Kaveri, *Multi-faceted role of naturally occurring autoantibodies in fighting pathogens*. *Adv Exp Med Biol*, 2012. **750**: p. 100-13.
221. Dimitrijevic, I., et al., *Increased angiotensin II type 1 receptor expression in temporal arteries from patients with giant cell arteritis*. *Ophthalmology*, 2009. **116**(5): p. 990-6.
222. Penn, H. and B. Dasgupta, *Giant cell arteritis*. *Autoimmun Rev*, 2003. **2**(4): p. 199-203.
223. Sharp, G.C., et al., *Mixed connective tissue disease--an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA)*. *Am J Med*, 1972. **52**(2): p. 148-59.
224. Moinzadeh, P., et al., *Disease progression in systemic sclerosis-overlap syndrome is significantly different from limited and diffuse cutaneous systemic sclerosis*. *Ann Rheum Dis*, 2015. **74**(4): p. 730-7.
225. Fairley, J.L., et al., *Clinical Features of Systemic Sclerosis-Mixed Connective Tissue Disease and Systemic Sclerosis Overlap Syndromes*. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2021. **73**(5): p. 732-741.

## **Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde im immunpathologischen Labor der medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von Frau Prof. Dr. Reinhild Klein durchgeführt.

Sie hat maßgeblich zur Konzeption der Studie, der Arbeit beigetragen und hat das Manuskript korrigiert.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Dr. Beate Preuss von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

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

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers



## 7 Veröffentlichung

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Lukas Bankamp\*, Beate Preuß\*, Ann-Christin Pecher, Nicola Beucke, Jörg Hennes und Reinhild Klein

Functionally Active Antibodies to the Angiotensin II Type 1-Receptor Measured by a Luminometric Bioassay Do Not Correlate With Clinical Manifestations in Systemic Sclerosis: A Comparison With Antibodies to Vascular Receptors and Topoisomerase I Detected by ELISA

*Frontiers in Immunology*, 2021. **12**: p. 78603

\*Beide Autoren trugen gleichermaßen zu der Publikation bei.

Lukas Bankamp\*, Beate Preuß\*, Ann-Christin Pecher, Wichard Vogel, Jörg Hennes und Reinhild Klein

Functional autoantibodies in systemic sclerosis: influence of autologous stem cell transplantation and correlation with clinical outcome

*Rheumatology (Oxford)*, 2023 Jun 1;62(6):2168-2177

\*Beide Autoren trugen gleichermaßen zu der Publikation bei.

## **8 Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich hiermit bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Reinhild Klein für das entgegengebrachte Vertrauen, die Bereitstellung des hochinteressanten Themas und den konstruktiven Austausch bedanken. Ich danke Ihr für die hervorragende, professionelle und warmherzige Betreuung und die Übernahme der mühevollen Arbeit des Korrekturlesens. Ohne Ihre Hilfe wäre diese Arbeit niemals zustande gekommen.

Großer Dank gilt Frau Dr. Beate Preuss für die nette Zusammenarbeit im Labor, die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung und Analyse der Experimente sowie der Auswertung der Ergebnisse. Auch bedanke ich mich für die zahlreichen thematischen Anregungen zu Beginn, sowie für den engen Austausch im Prozess dieser Arbeit und dem Korrekturlesen der vorliegenden Dissertation.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Immunpathologischen Labors für die Hilfsbereitschaft und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Auch möchte ich mich bei meinem lieben Laborpartner, Kommilitonen und Freund Johannes für die Unterstützung und die schöne gemeinsame Laborzeit bedanken.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich herzlich. Sie haben mir nicht nur mein Studium ermöglicht, sondern mich auch uneingeschränkt, liebevoll und vielseitig unterstützt.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Freundin Rebecca bedanken, die mich während der Bearbeitung dieser Dissertation und während des Studiums zu jeder Zeit bedingungslos unterstützt und gestärkt hat. Ihr offenes Ohr, Verständnis und motivierenden Worte haben maßgeblich zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen.

