Aus der

Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin II

(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, Klinische Immunologie, Rheumatologie)

Analyse zu Zytokinmuster der T-Helferzellsubpopulationen bei Patienten mit Systemischer Sklerose vor und nach autologer Stammzelltransplantation

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Olschner, Johannes Konrad

2025

Dekan:	Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter:	Professor Dr. J. Henes
2. Berichterstatter:	Professorin Dr. K. Schilbach-Stückle
Tag der Disputation:	19.08.2025

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 1

1.1 DEFINITION UND EPIDEMIOLOGIE DER SYSTEMISCHEN SKLEROSE 1

1.2 KLINIK 1

1.3 DIAGNOSTIK 2

1.4 EXKURS IMMUNSYSTEM 4

1.5 ÄTIOPATHOGENESE 7

1.6 THERAPIE DER SYSTEMISCHEN SKLEROSE 8

1.7 HÄMATOPOETISCHE STAMMZELLTRANSPLANTATION IM RAHMEN DER AST MOMA STUDIE 10

1.8 ZIELE DER ARBEIT 14

2 MATERIAL UND METHODEN 15

2.1 GENEHMIGUNG DER ETHIKKOMMISSION 15

2.2 MATERIAL 15

2.2.1 Reagenzien zur Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen 15

2.2.2 Reagenzien für den Proliferationsansatz 16

2.2.3 Reagenzien und Antikörper für die Durchführung der Zytokinexpressionsuntersuchung 16

2.2.4 Immunmodulierende Antigene 17

2.2.5 Materialien und Geräte 18

2.3 METHODEN 19

2.3.1 Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMCs) 19

2.3.2 Zellzahl Bestimmung 19

2.3.3 Antigenzugabe 20

2.3.4 Proliferationsansatz 21

2.3.5 Zytokinexpressionsuntersuchung der peripheren mononukleären Blutzellen 22

2.3.6 Definition Messzeitpunkte 23

2.3.7 Statistik 24

2.3.8 Definition T_H1- und T_H2-Typ *24*

2.3.9 Definition Responder / Non-Responder / Relapse anhand des mRSS *25*

2.3.10 Definition Endpunkte *26*

3 ERGEBNISSE 27

3.1 PATIENTENKOLLEKTIV 27

3.2 ERGEBNISSE PROLIFERATIONSANSATZ 28

3.2.1 Messzeitpunktvergleich T0 versus T1 und Folgende der Proliferationsanalyse ... 28

3.2.2 Ergebnisse V0 versus V1 der Proliferationsanalyse 33

3.3 ERGEBNISSE ZYTOKINEXPRESSIONSANALYSE 38

3.3.1 Messzeitpunktvergleich T0 versus T1 und Folgende der Zytokinexpressionsanalyse 38

3.3.2 T_H1 und T_H2-Typisierung anhand des Zytokinmuster 68

3.4 KLINISCHE DATEN (MODIFIZIERTER RODNAN SKIN SCORE) 71

3.5 GEGENÜBERSTELLUNG KLINISCHER UND IMMUNOLOGISCHER DATEN 72

3.5.1 T_H-Typisierung und mRSS der klinischen Non-Responder 72

3.5.2 T_H-Typisierung und mRSS der Patienten mit Relapse 73

3.5.3 T_H-Typisierung und mRSS, der vor Stammzelltransplantation T_H2-typisierten Probanden 74

3.6 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE 76

4 DISKUSSION 77

5 ZUSAMMENFASSUNG 86

6 LITERATURVERZEICHNIS 89

7 ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL 95

8 DANKSAGUNG 96

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
ACA	Anticentromere Antikörper
ACR	American College of Rheumatology
Ak	Antikörper
BCG	Bacillus Calmette Guerin
BSA	Bovines Serumalbumin
btx	Boostrix Injektionssuspension
CD	cluster differentation
CO	Kohlenmonoxid
Cyc	Cyclophosphamid
dcSSc	diffus kutane Systemische Sklerose
DLCO	Diffusionskapazität von Kohlenmonoxid
EF	Ejektionsfraktion
EULAR	European League against Rheumatism
EZM	Extrazellulärmatrix
FVC	forcierte Vitalkapazität
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HRCT	high-resolution computed tomography
HSCT	hematopoietic stem cell transplantation
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ILD	interstitielle Lungenerkrankung

KH2PO4	Kaliumdihydrogenphosphat
lcSSc	limitiert kutane Systemische Sklerose
LTT	Lymphozytentransformationstest
LV	linksventrikulär
MCP	Metacarpophalangeal
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMF	Mycophenolat Mofetil
mRSS	modifizierte Rodnan Skin Score
Na2HPO4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO3;	Natriumhydrogencarbonat
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
PAH	pulmonal arterielle Hypertonie
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	phosphat buffered saline
pg	Pikogramm
PM-SCL Ak	Exosom Antikörper
PPD	purified protein derivative
PWM	Pokeweed Mitogen
RPMI	Zellkulturmedium
RTX	Rituximab
Scl70	Topoisomerase 1
SSc	Systemische Sklerose
Tet	Tetanol

TGF	Transforming growth factor
T_H1	T- Helferzelle 1
TNF	Tumornekrosefaktor
U1-nRNP	small nuclear ribonucleoprotein particles

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: ACR / EULAR Diagnosekriterien 3

Tabelle 2: Antikörper bei SSc 3

Tabelle 3: untersuchte Zytokine und ihre Wirkungen 6

Tabelle 4: Risikofaktoren für schweren Verlauf der SSc im Rahmen der AST MOMA Studie 11

Tabelle 5: Ein- und Ausschlusskriterien der HSCT im Rahmen der AST MOMA Studie 11

Tabelle 6: Reagenzien zur Isolierung der PBMCs 15

Tabelle 7: Reagenzien für den Proliferationsansatz 16

Tabelle 8: Reagenzien und Antikörper für die Zytokinexpressionsuntersuchung 16

Tabelle 9: Immunmodulierende Antigene 17

Tabelle 10: Materialien und Geräte für Proliferations- bzw. Zytokinexpressionsuntersuchung 18

Tabelle 11: Definition und Normwerte der T_H-Typen 25

Tabelle 12: Probandenkollektiv AST MOMA Studie 27

Tabelle 13: T_H-Typisierung, der vor HSCT T_H2-polarisierten Probanden 70

Tabelle 14: T_H-Typisierung und mRSS der klinischen Non-Responder 73

Tabelle 15: T_H-Typisierung und mRSS der zwei Patienten mit Relapse nach initialem Ansprechen. 74

Tabelle 16: T_H-Typisierung und mRSS der vor Stammzelltransplantation T_H2-typisierten Probanden 75

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Allgemeines Schema der HSCT 10

Abbildung 2: Therapieschema AST-MOMA Studie 12

Abbildung 3: Bacillus Calmette-Guérin (BCG) stimulierte Proliferation (SI) je Messzeitpunkt (T). 29

Abbildung 4: Tetanol (Tet) stimulierte Proliferation (SI) je Messzeitpunkt (T)... 30

Abbildung 5: purified protein derivative (PPD) stimulierte Proliferation (SI) je Messzeitpunkt (T). 31

Abbildung 6: Topoisomerase I (Scl70) stimulierte Proliferation (SI) je Messzeitpunkt (T). 32

Abbildung 7: Bacillus Calmette-Guérin (BCG) stimulierte Proliferation vor (V0) und individuell frühestem Zeitpunkt nach (V1) hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT). 34

Abbildung 8: Tetanol (Tet) stimulierte Proliferation vor (V0) und individuell frühestem Zeitpunkt nach (V1) hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT). 35

Abbildung 9: purified protein derivative (PPD) stimulierte Proliferation vor (V0) und individuell frühestem Zeitpunkt nach (V1) hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT). 36

Abbildung 10: Topoisomerase I (Scl70) stimulierte Proliferation vor (V0) und individuell frühestem Zeitpunkt nach (V1) hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT). 37

Abbildung 11: Bacillus Calmette-Guérin (BCG) stimulierte IL-5 Produktion je Messzeitpunkt (T). 39

Abbildung 12: Tetanol (Tet) stimulierte IL-5 Produktion je Messzeitpunkt (T). . 40

Abbildung 13: purified protein derivative (PPD) stimulierte IL-5 Produktion je Messzeitpunkt (T). 40

Abbildung 14: Topoisomerase I (Scl70) stimulierte IL-5 Produktion je Messzeitpunkt (T). 41

Abbildung 15: Bacillus Calmette-Guérin (BCG) stimulierte IL-13 Produktion je Messzeitpunkt (T). 42

Abbildung 16: Tetanol (Tet) stimulierte IL-13 Produktion je Messzeitpunkt (T). 43

Abbildung 17: purified protein derivative (PPD) stimulierte IL-13 Produktion je Messzeitpunkt (T). 43

Abbildung 18: Topoisomerase I (Scl70) stimulierte IL-13 Produktion je Messzeitpunkt (T). 44

Abbildung 19: Bacillus Calmette-Guérin (BCG) stimulierte IFN-γ Produktion je Messzeitpunkt (T). 45

Abbildung 20: Tetanol (Tet) stimulierte IFN-γ Produktion je Messzeitpunkt (T). 46

Abbildung 21: purified protein derivative (PPD) stimulierte IFN-γ Produktion je Messzeitpunkt (T). 46

Abbildung 22: Topoisomerase I (Scl70) stimulierte IFN-γ Produktion je Messzeitpunkt (T). 47

Abbildung 23: Bacillus Calmette-Guèrin (BCG) stimulierte TNF-β Produktion je Messzeitpunkt (T). 48

Abbildung 24: Tetanol (Tet) stimulierte TNF-β Produktion je Messzeitpunkt (T). 49

Abbildung 25: purified protein derivative (PPD) stimulierte TNF-β Produktion je Messzeitpunkt (T). 49

Abbildung 26: Topoisomerase I (Scl70) stimulierte TNF-β Produktion je Messzeitpunkt (T). 50

Abbildung 27: Bacillus Calmette-Guérin (BCG) stimulierte IL-1α Produktion je Messzeitpunkt (T). 51

Abbildung 28: Tetanol (Tet) stimulierte IL-1α Produktion je Messzeitpunkt (T). 52

Abbildung 29: purified proteine derivative (PPD) stimulierte IL-1α Produktion je Messzeitpunkt (T). 52

Abbildung 30: Topoisomerase I (Scl70) stimulierte IL-1α Produktion je Messzeitpunkt (T). 53

Abbildung 31: Bacillus Calmette-Guérin (BCG) stimulierte IL-6 Produktion je Messzeitpunkt (T). 54

Abbildung 32: Tetanol (Tet) stimulierte IL-6 Produktion je Messzeitpunkt (T). . 55

Abbildung 33: purified proteine derivative (PPD) stimulierte IL-6 Produktion je Messzeitpunkt (T). 55

Abbildung 34: Topoisomerase I (Scl70) stimulierte IL-6 Produktion je Messzeitpunkt (T). 56

Abbildung 35: Bacillus Calmette-Guérin (BCG) stimulierte IL-17 Produktion je Messzeitpunkt (T). 57

Abbildung 36: Tetanol (Tet) stimulierte IL-17 Produktion je Messzeitpunkt (T). 58

Abbildung 37: purified proteine derivative (PPD) stimulierte IL-17 Produktion je Messzeitpunkt (T). 58

Abbildung 38: Topoisomerase I (Scl70) stimulierte IL-17 Produktion je Messzeitpunkt (T). 59

Abbildung 39: Bacillus Calmette-Guérin (BCG) stimulierte TNF-α Produktion je Messzeitpunkt (T). 60

Abbildung 40: Tetanol (Tet) stimulierte TNF-α Produktion je Messzeitpunkt (T). 61

Abbildung 41: purified proteine derivative (PPD) stimulierte TNF-α Produktion je Messzeitpunkt (T). 61

Abbildung 42: Topoisomerase I (Scl70) stimulierte TNF-α Produktion je Messzeitpunkt (T). 62

Abbildung 43: Bacillus Calmette-Guérin (BCG) stimulierte IL-10 Produktion je Messzeitpunkt (T). 63

Abbildung 44: Tetanol (Tet) stimulierte IL-10 Produktion je Messzeitpunkt (T). 64

Abbildung 45: purified proteine derivative (PPD) stimulierte IL-10 Produktion je Messzeitpunkt (T). 64

Abbildung 46: Topoisomerase I (Scl70) stimulierte IL-10 Produktion je Messzeitpunkt (T). 65

Abbildung 47: Bacillus Calmette-Guérin (BCG) stimulierte GM-CSF Produktion je Messzeitpunkt (T). 66

Abbildung 48: Tetanol (Tet) stimulierte GM-CSF Produktion je Messzeitpunkt (T). 67

Abbildung 49: purified proteine derivative (PPD) stimulierte GM-CSF Produktion je Messzeitpunkt (T). 67

Abbildung 50: Topoisomerase I (Scl70) stimulierte GM-CSF Produktion je Messzeitpunkt (T). 68

Abbildung 51: Anzahl der T_H-Typen je Messzeitpunkt (T). 69

Abbildung 52: mRSS je Untersuchungszeitpunkt (U). 71

1 Einleitung

1.1 Definition und Epidemiologie der Systemischen Sklerose

Die Systemische Sklerose (SSc) ist eine chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung aus der Gruppe der Kollagenosen. Sie geht mit einem fibrotischen Umbau von Haut und inneren Organen einher und kann potenziell letal verlaufen. Die weltweit gepoolte Prävalenz beträgt 17,6 pro 100.000 Einwohner mit teils deutlichen regionalen Unterschieden. So ist die Prävalenz der Erkrankung in Nord (25,9) - und Südamerika (24,8) höher als in Europa (14,8) und Asien (6,8). Frauen sind weltweit 5 mal häufiger betroffen als Männer (Bairkdar et al., 2021) und der Altersgipfel der Erkrankung liegt zwischen der 4. und 6. Lebensdekade (Bergamasco et al., 2019).

1.2 Klinik

Das klinische Bild der Erkrankung ist anfangs heterogen. Sie beginnt häufig mit einem Raynaud Syndrom, welches bei bis zu 90% der Patienten auftritt (Walker et al., 2007) und der eigentlichen Erkrankung je nach Verlaufsform teilweise um mehrere Jahre vorausgehen kann (Rosendahl et al., 2022). Hierbei kommt es initial zu einem Abblassen der Finger mit anschließender Zyanose gefolgt von einer Errötung durch reaktive Durchblutung. Neben unspezifischen Symptomen wie subfebrilen Temperaturen, Abgeschlagenheit und depressiver Verstimmung sind die kutanen Manifestationen wie etwa eine Sklerodaktylie mit Fingerkuppennekrosen häufig und spezifischer für die Erkrankung. So ist die Haut in über 90% der Fälle mitbetroffen. Eine SSc ohne Beteiligung der Haut (Systemische Sklerose sine scleroderma) ist beschrieben, jedoch als eigenständige Form umstritten (Diab et al., 2014). Die Häufigkeitsangaben schwanken hier zwischen 5-10% (Denton and Khanna, 2017, Poormoghim et al., 2000). Kutane Manifestationen sind für die Patienten im Alltag psychisch und physisch sehr belastend, wohingegen extrakutane Manifestationen die Prognose der Erkrankung bestimmen (Denton and Khanna, 2017). Die Lunge ist in ca. 80%

der Fälle betroffen. Eine gefürchtete Komplikation ist der Übergang in eine progressive, interstitielle Lungenerkrankung (ILD), die bei 25-30% der Patienten zu beobachten ist, als auch die Entwicklung einer pulmonal arteriellen Hypertonie (PAH) (15%) (Denton and Khanna, 2017, Perelas et al., 2020). Zusammen stellen Sie die häufigsten Todesursachen bei SSc Patienten dar (Tashkin et al., 2006a). Die Erkrankung lässt sich grob in 2 Verlaufsformen unterteilen, die jedoch nicht immer streng voneinander abgrenzbar sind und ineinander übergehen können. Eine Differenzierung ist nicht immer möglich. Die limitiert kutane Systemische Sklerose (lcSSc) (ca. 45%) betrifft nur die distalen Extremitäten und/ oder das Gesicht. Sie verläuft langsamer als die diffuse Verlaufsform. Ein Raynaud- Syndrom wird teilweise viele Jahre vor den ersten Hautsymptomen beobachtet, während ein Organbefall seltener ist. Laborchemisch sind vor allem Antikörper gegen Zentromere (ACA) in 70% der Fälle erhöht. Die diffus kutane systemische Sklerose (dcSSc) (30-35%) führt rasch zu einer Hautverdickung, die den Körperstamm und/oder proximale Extremitäten miteinschließt, und eher eine zentrifugale Ausbreitung zeigt. Ein Raynaud Syndrom tritt dabei häufig mit den ersten Hautsymptomen auf und ein Befall von inneren Organen und Gelenken wird früh beobachtet. Der Verlauf ist schubweise und meist rasch progredient. Laborchemisch finden sich erhöhte Anti-Scl70-Antikörper in 40% der Fälle, sowie erhöhte RNA Polymerase III-Antikörper. Die Prognose ist deutlich schlechter als bei der lcSSc. (Frerix et al., 2013, Herold, 2018).

1.3 Diagnostik

Die Diagnostik der Erkrankung kann insbesondere im Anfangsstudium aufgrund unspezifischer Symptome eine Herausforderung darstellen. Klinisch wegweisend sind das Raynaud Syndrom und die o.g. Hautveränderungen. Einer gründlichen Anamnese und Ganzkörperuntersuchung kommt daher eine große Bedeutung zu. Laborchemisch sollte eine Antikörperdiagnostik und bildgebend eine Kapillarmikroskopie durchgeführt werden. Zum Nachweis eines Befalls innerer Organe muss eine Lungenfunktionsdiagnostik, CT-Thorax-Untersuchung und Echokardiographie ggf. mit Rechtsherzkatheter durchgeführt werden. Die

Diagnose kann anhand der ACR / EULAR Klassifikationskriterien gestellt werden, wobei ein Score ≥ 9 mit einer 90% Sensitivität und Spezifität für das Vorliegen einer SSc spricht (siehe *Tabelle 1*).

Tabelle 1: ACR / EULAR Diagnosekriterien

Quelle: (van den Hoogen et al., 2013)

Kriterien	Subkriterien	Punkte
Hautverdickung der Finger	Beide Hände, proximal der Metacarpophalangeal (MCP)- Gelenke	9
Hautverdickung der Finger	Geschwollener Finger, Ganzer Finger (distal bis MCP)	2 4
Läsionen der Fingerkuppe	Digitale Ulzera, Narbengrübchen	2 3
Teleangiektasien		2
Abnorme Nagelfalzkapillaren		2
Lungenbeteiligung	Pulmonale Hypertonie u./o. interstitielle Lungenerkrankung	2
Raynaud- Syndrom		3
Sklerodermie- assoziierte Antikörper	ACA; Anti- Scl-70; Anti- RNA Polymerase 3	3

Tabelle 2: Antikörper bei SSc

Quelle: (van den Hoogen et al., 2013)

Antikörper (Häufigkeit)	Besonderheit
Anti- Nukleäre (ANA) AK (90%)	
Scl70 AK (40%)	v.a. bei diffuser Verlaufsform
ACA AK (70%)	v.a. bei der limitierten Form
RNA Polymerase III Antikörper (20%)	Assoziiert mit schwerer Haut- und Nierenbeteiligung
PM-Scl AK (≈5%)	Beide assoziiert mit Polymyositis Überlappungssyndromen

U1-nRNP AK (≈5%)	
Fibrillarin AK (≈5%) Th (To) AK (≈5%)	Beide assoziiert mit pulmonaler Hypertonie

Zur Beurteilung der Haut im Krankheitsverlauf wird häufig der modifizierte Rodnan Skin Score (mRSS) angewandt. Hierbei werden 17 Regionen der Haut im Hinblick auf die Hautdicke untersucht und Punkte zwischen 0 und 3 vergeben (0 = unauffällig, 1 = verdickt aber Hautfalte abheben möglich, 2 = Hautfalte abheben nicht mehr möglich, 3 = Beweglichkeit eingeschränkt). Der maximal zu erreichende Punktwert beträgt 51. Je höher der Score, desto stärker ist der Hautbefall ausgeprägt (Khanna et al., 2017).

1.4 Exkurs Immunsystem

Um die Ätiopathogenese der Erkrankung besser nachvollziehen zu können, ist ein kurzer Exkurs in den Aufbau und die Funktionsweise des Immunsystems hilfreich.Das Immunsystem ist das zentrale Abwehrsystem des menschlichen Körpers. Es zeichnet sich durch eine beeindruckende Komplexität und Dynamik aus, die leider in vielen Teilen noch nicht verstanden ist. Etabliert ist die Einteilung in ein angeborenes und ein erworbenes Immunsystem. Diese sollte jedoch nicht als absolut betrachtet werden, sondern führt vielmehr erst durch gegenseitige Interaktion zu einem funktionierenden Abwehrmechanismus. Das angeborene Immunsystem ist von Geburt an aktiv und schützt den Organismus durch physikalische, chemische, humorale, aber auch zelluläre Mechanismen. Aufgrund der Tatsache, dass keine Anpassung an den Erreger erforderlich ist, besteht ein schneller und direkter, unspezifischer Schutz. Im Gegensatz hierzu besteht das erworbene Immunsystem aus antigenspezifischen Zellen, die aktiviert werden müssen, bevor sie potenzielle Krankheitserreger eliminieren können. Sie ist daher langsamer als die angeborene Abwehr, dafür effektiver und bei erneuter Infektion mit dem gleichen Erreger kann umgehend eine hochspezifische Immunantwort erfolgen. Um die Wege des erworbenen Immunsystems zu verstehen, hilft es die 2 Haupttypen der T-Zellen ($CD8^+$ und

$CD4^+$ T-Zellen) sowie ihre Reaktionen näher zu betrachten. $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen können, nachdem ihnen Antigene über MHC 1 präsentiert werden, diese mittels direkter Zelllyse oder über Einleitung einer Apoptose durch Proteasen und Perforine eliminieren. MHC1 ist dabei ein Proteinkomplex, der auf allen kernhaltigen Zellen zu finden ist und der der Antigenpräsentation von körpereigenen oder körperfremden Polypeptiden, wie z.B. Viren oder entarteten Zellen, dient. $CD4^+$ T-Helferzellen ($CD4^+$ T_H-Zellen) lassen sich u.a. anhand ihres Zytokinmusters nochmal in $CD4^+$ T_H1-Zellen, welche vor allem intrazelluläre Erreger bekämpfen und $CD4^+$ T_H2-Zellen, die das Immunsystem bei der Bekämpfung extrazellulärer Erreger wie Bakterien und Parasiten unterstützen, unterscheiden. T_H1-Zellen sezernieren dabei vorwiegend Interferon-y (IFN-γ), IL-2 und TNF-α, während T_H2-Zellen vor allem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 ausschütten (Mosmann et al., 1986, Murphy and Weaver, 2018). Zu beachten ist jedoch, dass die Unterscheidung anhand des Zytokinmusters nicht nur auf $CD4^+$ T-Zellen, sondern ebenfalls auf $CD8^+$ T-Zellen angewandt werden darf (Singh et al., 1999).

Über MHC2 können antigenpräsentierende Zellen, wie Makrophagen, B-Zellen oder dendritische Zellen den $CD4^+$ T-Zellen ihre aufgenommenen und prozessierten Antigene präsentieren. $CD4^+$ T_H1-Zellen werden beispielsweise nach Antigenpräsentation durch Makrophagen zur Produktion von Zytokinen, u.a. INF-y, TNF-α und IL-2 angeregt, welche wiederum in einem positiven Feedback Mechanismus Makrophagen und $CD8^+$ zytotoxisch T-Zellen stimulieren, um eine zellulär vermittelte Eliminierung zu generieren (McComb et al., 2019). Die ausgeschütteten Zytokine bedingen und verstärken nicht nur die T_H1-Aktivierung, sondern hemmen zeitgleich die T_H2-Antwort. Die $CD4^+$ T_H2-Zellen interagieren hingegen vorwiegend mit B-Zellen. Sie schütten nach Antigenpräsentation IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 (siehe *Tabelle 3*) aus. Dies fördert nicht nur die Umwandlung von B-Zellen in Plasmazellen bzw. die Bildung von Antikörpern, welche letztendlich die Antigene humoral eliminieren, sondern bewirkt u.a. auch eine Hemmung der Makrophagenaktivierung bzw. der IFN-γ Produktion und damit eine Hemmung der T_H1-Aktivierung (Klein et al., 2006). Zudem wird die Bildung von eosinophilen Granulozyten gefördert. Es wird also

deutlich, dass eine Aktivierung des einen Weges gleichzeitig auch eine Hemmung des anderen nach sich zieht. Dennoch findet man im peripheren Blut häufig auch T-Zellen, die sowohl Teile eines T_H1- als auch T_H2-Zytokinmusters aufweisen, weshalb die o.g. Einteilung nicht als absolut betrachtet werden darf. Sie hilft jedoch, sich der Pathogenese von Autoimmunerkrankung und der Entwicklung von Allergien zu nähern (Singh et al., 1999). So kann eine reduzierte T_H1-Immunantwort das Risiko, an Tumore oder angeborene Immundefekte zu erkranken, erhöhen, während eine verstärkte Aktivierung des T_H1-Weges prädisponierend auf die Entwicklung von vorwiegend organspezifischen Autoimmunerkrankungen wirkt. Ebenso kann eine zu starke T_H2-Aktivierung zur Ausbildung von Allergien oder vorwiegend systemischen Autoimmunerkrankungen führen (Klein et al., 2006, Singh et al., 1999). Eine Erkrankung, bei der ein gestörtes T_H1/T_H2 Verhältnis zu Gunsten einer T_H2-Polarisierung vorliegt, ist die Systemische Sklerose (Kuzumi et al., 2021, Paleja et al., 2020). Auf die Ätiopathogenese der Erkrankung soll im Nachfolgenden näher eingegangen werden.

Tabelle 3: untersuchte Zytokine und ihre Wirkungen
Quelle: (Murphy and Weaver, 2018)

Interleukine	Produzierende Zellen	Wirkungen
IL-1α	Makrophagen, Epithelzellen	Fieber, T-Zellaktivierung, Makrophagenaktivierung
IL-5	T-Zellen, Mastzellen	Wachstum und Differenzierung von Eosinophilen
IL-6	T-Zellen, Makrophagen, Endothelzellen	Proinflammatorisch, Akute Phase Protein
IL-10	Makrophagen, dendritische Zellen, T- und B-Zellen	Hemmt die Makrophagenaktivierung
IL-13	T-Zellen	Hemmt T_H1-Zellen und Produktion inflammatorischer Zytokine durch Makrophagen, fördert Wachstum und Differenzierung von B-Zellen, löst Allergien / Asthma aus

IL-17	T_H17-Zellen, $CD8^+$ T-Zellen, NK-Zellen, Neutrophile	proinflammatorisch
IFN-γ	T-Zellen, NK-Zellen, Neutrophile	Hemmt T_H2- und T_H17-Zellen
GM-CSF	Makrophagen und T-Zellen	stimuliert Wachstum und Differenzierung der Myelomonozyten Reihe, v.a. der dendritischen Zellen
TNF-α	Makrophagen, NK- Zellen, T-Zellen	Proinflammatorisch
TNF-β	T-Zellen und B-Zellen	Endothelaktivierung

1.5 Ätiopathogenese

Die Ätiopathogenese der Erkrankung ist komplex und bisher noch nicht vollständig verstanden. Es konnten einige genetische, sowie epigenetische Veränderungen und Umweltfaktoren, ausgemacht werden, die die Entwicklung der Erkrankung begünstigen können. Aufgrund niedriger Konkordanzraten bei monozygoten Zwillingen geht man davon aus, dass eine genetische Prädisposition alleine nicht ursächlich ist, sondern auch epigenetische Veränderungen, beispielsweise aufgrund von Exposition gegenüber Umweltfaktoren (Broen et al., 2014), wie etwa Siliziumdioxid, Lösungsmittel oder Kohlenwasserstoffe, die Ausbildung der Erkrankung begünstigen können (De Martinis et al., 2016).

Im Zentrum der Pathophysiologie steht eine chronisch entzündliche Fibrose aufgrund eines fehlregulierten Bindegewebsstoffwechsels. Man geht von einer frühzeitigen endothelialen Schädigung aus, die, gefolgt von einer veränderten Immunantwort und einem entzündlichen Infiltrat, in einem fibrotischen Umbau der Haut und inneren Organe mündet. Auch wenn der genaue Grund, warum es zu einer Schädigung des Endothels und zu einer veränderten Immunantwort kommt und wie sich diese möglicherweise gegenseitig bedingen, nicht ausreichend geklärt ist (Brown and O'Reilly, 2019, Rosendahl et al., 2022), scheint es wachsende Evidenz darüber zu geben, dass eine veränderte T-Zellantwort als

ein Hauptgrund für die Pathogenese der Erkrankung angesehen werden kann (Jin et al., 2022). So konnte gezeigt werden, dass SSc Patienten eine erhöhte Serumkonzentration an T_H2-Zytokinen wie IL-4, IL-13 aber auch TGF-β aufweisen (Denton and Abraham, 2001, Hasegawa et al., 1997). Sowohl IL-4 als auch IL-13 werden vornehmlich von T_H2-Zellen produziert (siehe *Tabelle 3*), welche selbst im Verlauf eine B-Zellproliferation sowie Immunglobulinproduktion hervorrufen. Ferner aktivieren sie die TGF-β Produktion sowie die Proliferation und Differenzierung von Fibroblasten und führen somit zu einer verstärkten Kollagensynthese und Aufbau der Extrazellulärmatrix (EZM). TGF-β wirkt selbst proinflammatorisch und fördert die Fibrosierung. Es wird als einer der entscheidenden Mediatoren für die Fibrosierung bei SSc Patienten angesehen (Rosendahl et al., 2022). Neben T-Zellen scheinen Makrophagen eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Erkrankung zu spielen. Zum einen sind sie ebenfalls in der Lage große Mengen an IL-4, IL-13 und TGF-β sowie proinflammatorisch wirkendes IL-6 zu produzieren, zum anderen bewirkt ein Teil der Makrophagen eine vermehrte EZM Produktion sowie ein Crosslinking der Kollagenbündel, was beides zu einer verstärkten Fibrosierung beiträgt (Rosendahl et al., 2022). Trotz, dass noch viele Mechanismen in der Ätiopathogenese der Erkrankung ungeklärt sind, liefern die bereits gewonnenen Erkenntnisse, bezüglich des gestörten T-Helferzell-Gleichgewichts hin zu einer T_H2-Polarisierung, nicht nur wertvolle Erklärungs- sondern auch Therapieansätze. So spielen Behandlungen, die auf eine Regulation der gestörten T-Zellfunktion abzielen, eine immer größere Rolle und zeigten bereits erste Erfolge (Jin et al., 2022).

1.6 Therapie der Systemischen Sklerose

Die Therapie der SSc sollte an spezialisierten Zentren erfolgen und besteht aus einer interdisziplinären Lokal- und Systemtherapie in Kombination mit Psycho- und Physiotherapie. Es sind in der Vergangenheit Fortschritte in der Behandlung erzielt worden, die eine günstige Beeinflussung des Krankheitsverlaufs ermöglichen können. Eine Heilung ist trotz alledem nach derzeitigem

Kenntnisstand nicht möglich. Die Therapie richtet sich daher im Wesentlichen nach der Erkrankungsausprägung. In frühen Stadien der Hautfibrosierung, insbesondere bei diffuser Verlaufsform, wird eine Behandlung mit Methotrexat (MTX), einem Folsäure Antagonisten, empfohlen (Kowal-Bielecka et al., 2017). Bei ausgeprägter Hautfibrosierung zeigt u.a. Rituximab (RTX), ein monoklonaler CD20-Antikörper, in zwei japanischen Studien eine Verbesserung des mRSS unter 24- bzw. 48- wöchiger Anwendung (Ebata et al., 2021, Ebata et al., 2022), woraufhin RTX in Japan eine Zulassung zur Therapie der Hautfibrosierung erhielt. Bei Patienten mit Lungenbeteiligung in Form einer SSc-ILD kommt eine Therapie mit Mycophenolat Mofetil (MMF) oder Cyclophosphamid (Cyc) in Frage. Beide Substanzen zeigten in kontrolliert, randomisierten Studien eine moderat, aber signifikant verbesserte Lungenfunktion, Lebensqualität, Hautverdickung und einen verbesserten Dyspnoe Score (Tashkin et al., 2006b). Im direkten Vergleich der Substanzen zeigte MMF zwar keine verbesserte Wirksamkeit gegenüber Cyc, jedoch eine bessere Verträglichkeit und geringere Toxizität (Tashkin et al., 2016). Neben MMF und Cyc kann Nintedanib, ein Tyrosinkinaseinhibitor, zur Therapie der SSc-ILD herangezogen werden. Nintedanib offenbarte über 52 Wochen im Vergleich mit einem Placebo einen verlangsamten Abfall der FVC und damit eine verringerte Abnahme der Lungenfunktion (Distler et al., 2019). In den USA ist ferner Tocilizumab, ein monoklonaler Antikörper gegen den Interleukin-6- Rezeptor, zur Therapie der SSc-ILD zugelassen (Khanna et al., 2020).

Bei ausgewählten Patienten mit rasch fortschreitender SSc und frühem Befall lebenswichtiger Organe, wie Herz und Lunge, sollte eine autologe, hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT) an einem spezialisierten Zentrum in Erwägung gezogen werden. Diese konnte in drei randomisiert, kontrollierten Studien eine Überlegenheit gegenüber einer herkömmlichen Cyc-Stoßtherapie zeigen (Burt et al., 2011, Sullivan et al., 2018, van Laar et al., 2014). Bei der HSCT von SSc Patienten werden allgemein Ansprechraten von bis zu 90% erzielt. Darüber hinaus konnte die Effektivität der nicht-myeloablativen HSCT bei SSc in einem Real-Life-Setting in einer großen, europäischen nicht-interventionellen Multicenter Studie bestätigt werden (Henes et al., 2021). Die

therapieassoziierte Mortalität der HSCT liegt jedoch bei 6-11% (Burt et al., 2011, Henes et al., 2012, Sullivan et al., 2018, van Laar et al., 2014).

1.7 Hämatopoetische Stammzelltransplantation im Rahmen der AST MOMA Studie

Die HSCT lässt sich allgemein in vier Phasen unterteilen (siehe *Abbildung 1*). In der Mobilisierungsphase kommt es durch die Gabe eines Zytostatikums und G-CSF zur Mobilisierung hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut. Im Anschluss erfolgt die Leukapherese, bei der die zuvor mobilisierten Stammzellen gewonnen und im Anschluss, ggf. für CD34 selektioniert und kryokonserviert werden. In der Konditionierungsphase wird durch die Gabe einer Hochdosis Chemotherapie in Kombination mit einer Antikörpertherapie eine Immunablation erreicht. Nach der Konditionierungstherapie werden die zuvor entnommenen Stammzellen retransfundiert. Ziel ist es, durch eine Art Reset des Immunsystems, die autoimmune Reaktion zu unterbrechen bzw. zu verhindern. Die genaue Wirkungsweise ist allerdings noch nicht genau bekannt.

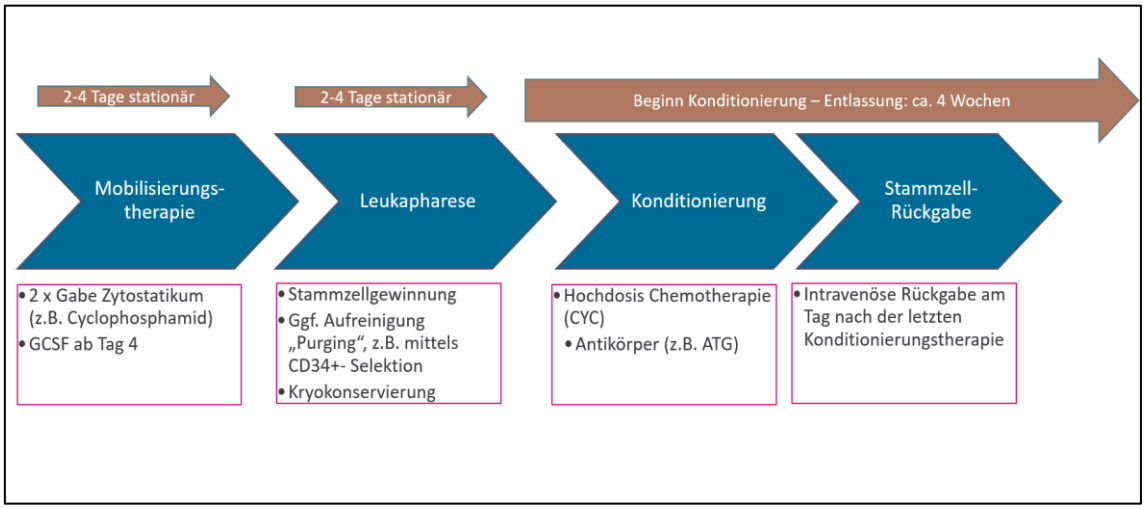

Abbildung 1: Allgemeines Schema der HSCT
Abbildung adaptiert von (Henes and Pecher, 2024) (GCSF = Granulozyten- Kolonie stimulierender Faktor; CYC = Cyclophosphamid; ATG = Antithymoglobulin)

Im Rahmen der AST MOMA Studie (Autologous Stem Cell Transplantation in SSc– MOdification according to MAnifestation) wurden zwischen 2012 und 2020 35 SSc Patienten einer nicht-myeloablativen HSCT in Tübingen unterzogen. Indiziert war die Therapie bei Patienten mit Progress unter Cyclophosphamid und > 2 Risikofaktoren. In der nachfolgenden *Tabelle 4* und *5* sind die Risikofaktoren der SSc sowie eine Auswahl an Ein- und Ausschlusskriterien der Studie aufgeführt.

Tabelle 4: Risikofaktoren für schweren Verlauf der SSc im Rahmen der AST MOMA Studie

Risikofaktoren für schweren Verlauf der SSc
- Progressiv-systemische Form mit diffusem Hautbefall
- Alter < 40 Jahre bei Erstmanifestation
- Männliches Geschlecht
- Nachweis von Scl70-Antikörpern
- Hohe Entzündungszeichen (BSG > 30 mm / 1 h, CRP >1 mg / dl)
- Kardiale Beteiligung
- Pulmonal-arterielle Hypertonie
- Nierenbeteiligung

Tabelle 5: Ein- und Ausschlusskriterien der HSCT im Rahmen der AST MOMA Studie

Einschlusskriterien (Auswahl)
- Alter 18 - 65 Jahre
- Krankheitsdauer ≤ 6 Jahre UND Organmanifestation: Herz u. / o. Lunge u. / o. Niere
- Progress innerhalb von 6 Monaten trotz Cyc-Vortherapie
- Progress: Haut: Zunahme mRSS: 25%; Lunge: Verschlechterung um 15% in der DLCO und/ oder > 10% in der FVC und/ oder Zunahme der Fibrose im HRCT; Herz: Verschlechterung der LV-Funktion um >10%
Ausschlusskriterien (Auswahl)
- EF < 30% im Echo und / oder PAPsys > 50 mmHg
- FVC < 50% der Norm oder CO- Diffusionskapazität SB < 40%

-	Fortgesetzter Nikotinkonsum
-	Unkontrollierte Infektionen oder Malignom

Bei Therapieindikation wurden in dieser Studie mittels Cyc (2 x 1000 mg) und G-CSF die hämatopoetischen Stammzellen mobilisiert (siehe *Abbildung 2*). Bei Vorhandensein einer Alveolitis wurde die Cyc Dosis (2 x 1500 mg) erhöht. Nach Entnahme und Selektion der $CD34^+$ Stammzellen erfolgte im Rahmen der Konditionierung mittels Cyc (2 x 50 mg / kg KG) sowie Kaninchen Antithymoglobulin (rATG) (4 x 10 mg / kg KG) eine Immunablation. Bei kardialer Vorschädigung, welche bei SSc Patienten häufig vorzufinden ist (Mueller et al., 2015), wurde die Cyc Dosis (2 x 50 mg / kg KG) reduziert und Thiotepa (2 x 5 mg / kg KG) hinzugegeben. Sowohl Cyc als auch Thiotepa wirken zytostatisch, wobei insbesondere hochdosiertes Cyc kardiotoxische Nebenwirkungen haben kann. Eine reduzierte Cyc Dosis bei Zugabe von Thiotepa erwies sich in einer zuvor durchgeführten Pilotstudie als dennoch effektive Therapieoption bei reduzierter Kardiotoxizität (Henes et al., 2014).

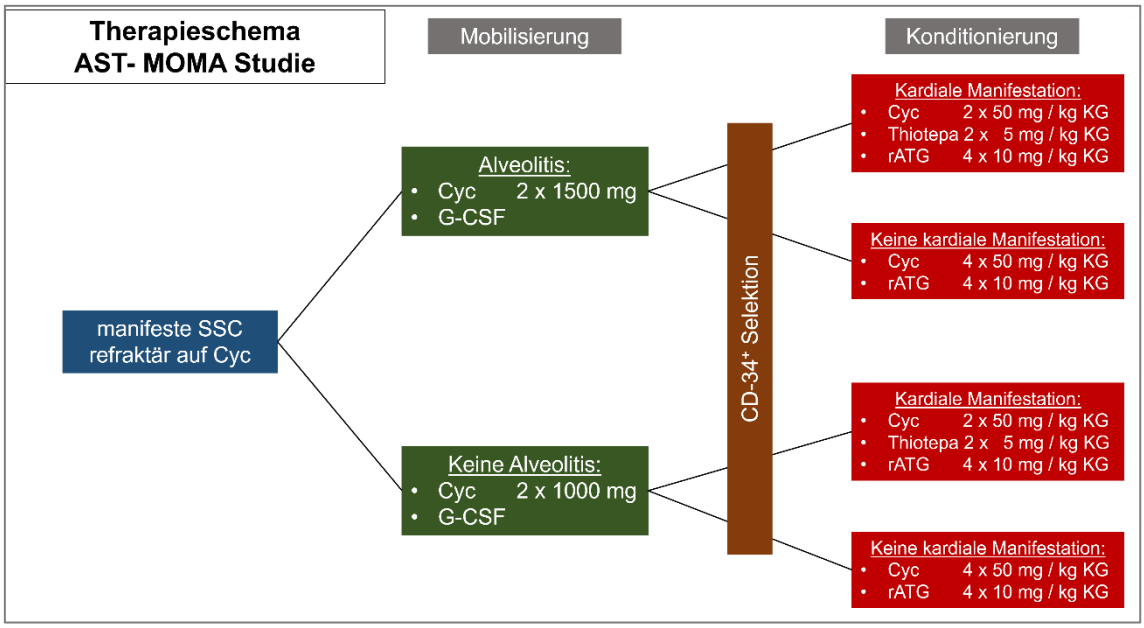

Abbildung 2: Therapieschema AST-MOMA Studie

(SSC = Systemische Sklerose, Cyc = Cyclophosphamid, G-CSF = Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor, rATG = rabbit Antithymoglobulin)

1.8 Ziele der Arbeit

Es ist weitgehend unklar, wie genau die HSCT bei SSc Patienten wirkt. Die Annahme eines „Reset“ des Immunsystems mit anschließender Etablierung neuer, nicht autoreaktiver Vorläuferzellen ist vereinfacht und konnte noch nicht ausreichend wissenschaftlich belegt werden. Ein Hauptaugenmerk der Therapie liegt auf einer Regulation der gestörten T-Zellfunktion (Jin et al., 2022). Um den Einfluss der HSCT auf das Immunsystem näher zu untersuchen, führten wir zwischen 2013 bis 2020 Lymphozytentransformationstests bei 33 SSc- Patienten aus der AST MOMA Studie vor und bis zu 3 Jahre im Verlauf nach HSCT durch. Dabei sollten Veränderungen der T-Helferzellsubpopulationen insbesondere der T_H1/T_H2 Balance genauer untersucht werden. Ferner sollten die Auswirkungen der HSCT auf klinische Parameter wie den mRSS, welcher ebenfalls vor und im Verlauf nach HSCT erhoben wurde, dargestellt werden. Schlussendlich war ebenfalls von Interesse, ob sich im Vergleich der erhobenen immunologischen und klinischen Daten Auffälligkeiten ergeben. Diesbezüglich erfolgte eine Gegenüberstellung von T_H-Subtyp und mRSS für verschiedene Subgruppen unseres Patientenkollektivs zu verschiedenen Zeitpunkten.

Als primären Endpunkt definierten wir die Reduktion der T_H2-Polarisierung, gemessen als eine statistisch signifikante Abnahme ($p < 0.05$) der T_H-2 Antigen-stimulierten Proliferation und / oder Zytokinexpression nach HSCT gegenüber dem Vortransplantationszeitraum. Als sekundären Endpunkt definierten wir einen Wechsel des T_H2-Typs nach Transplantation gegenüber dem Vortransplantationszeitraum. Ferner wurde als explorativer Endpunkt Veränderungen im mRSS und T_H-Typs im direkten Vergleich für verschiedene Subgruppen unseres Patientenkollektivs untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Genehmigung der Ethikkommission

Die klinische Studie *„Analyse zu Zytokinmuster der T-Helferzellsubpopulationen bei Patienten mit Systemischer Sklerose vor und nach autologer Stammzelltransplantation“* wurde von der Ethikkommission der Eberhard-Karls-Universität Tübingen und des Universitätsklinikums Tübingen unter der Projektnummer 112/2023BO2 positiv beurteilt. Alle Patienten gaben Ihr schriftliches Einverständnis im Rahmen der AST MOMA Studie.

2.2 Material

2.2.1 Reagenzien zur Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen

Tabelle 6: Reagenzien zur Isolierung der PBMCs

Heparin-Natrium ratiopharm®	Injektionslösung 5000 IE *Ratiopharm GmbH*
RPMI 1640 Medium (1x)	5,5 g / l NaCl, 5 mg / l Phenolrot, 2 g / l $NaHCO_3$, 25 mM HEPES *BIOCHROM AG*
Refobacin®	Gentamicinsulfat *MERCK*
HBSS (1x)	Hanks’ Balanced Salt Solution w/o $CaCl_2$, w/o $MgCl_2$ *GIBCO / Invitroge*
Biocoll separating solution (Ficoll)	Dichte: 1,077 g / ml *BIOCHROM AG*
Acridin-Orange	*MERCK*

2.2.2 Reagenzien für den Proliferationsansatz

Tabelle 7: Reagenzien für den Proliferationsansatz

[Methyl-3H] Thymidin 74 GBq / mmol	*Hartmann Analytic*
ULTIMA Gold	*Packard*

2.2.3 Reagenzien und Antikörper für die Durchführung der Zytokinexpressionsuntersuchung

Tabelle 8: Reagenzien und Antikörper für die Zytokinexpressionsuntersuchung

PBS-Puffer (60 mM; pH 7,4)	6,81 g KH2PO4; 43,83 g NaCl; 44,49 g Na2HPO4 ; gelöst in 5 l Aquadest
Waschpuffer (pH 7,4)	1 x PBS + 0,05% BSA
Bicarbonat-Puffer (0,2 M; pH 9,6)	33,90 g Na2 CO3; 57,12 g NaHCO3; gelöst in 5 l Aquadest
Citrat-Puffer (0,1 M; pH 5,0)	82,36 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat; 25,20 g Citronensäure- Monohydrat; gelöst in 4 l Aquadest
Substrat-Lösung	0,5 mg o-Phenyldiamin / ml Citratpuffer; 33 µl H2O2 (30%) / 100 ml Puffer
Avidin-Peroxidase	Sigma
25 % -ige Schwefelsäure	Merck
IL-1α, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, GM-CSF, IFN-γ, TNF-α, TNF-β	BD Biosciences Pharmingen
Maus anti-human: IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, GM-CSF, IFN-γ, TNF-α, TNF-β	BD Biosciences Pharmingen

anti-human IL-1α	R&D Systems
Ratte anti-human biotinyliert IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, GM-CSF, IFN-γ, TNF-α, TNF-β	BD Biosciences Pharmingen
anti-human IL-1α biotinyliert	R&D Systems

2.2.4 Immunmodulierende Antigene

Tabelle 9: Immunmodulierende Antigene

BCG-medac	2 x 108 – 3 x 109 Einheiten von BCG (Stamm RIVM) *Pulver medac GmbH* (PZN: 02736461)
Tetanol ® pur (Tet)	Konservierungsmittelfreier Tetanus-Toxoid-Absorbat- Impfstoff 8 I.E. / ml *Novartis* (PZN: 02038952)
Tuberkulin PD RT 23 SSI	enthält 0,4 µg / ml Tuberkulin PPD (purified protein derivative) *STATENS SERUM INSTITUT*
SCL70	Konzentration 1,13 (mg / ml) *Diarect*
Pokeweed Mitogen (PWM)	0,4 mg Protein / Flasche *BIOCHROM AG*
Boostrix Injektionssuspension (btx)	2 IE / Ampulle *GlaxoSmith GmbH und Co. KG*

2.2.5 Materialien und Geräte

Tabelle 10: Materialien und Geräte für Proliferations- bzw. Zytokinexpressionsuntersuchung

BLUE MAX ™ 50 ml, Konische Röhrchen, Polyproyplen	*Becton Dickinson Labware*
Cellstar® Zellkulturröhrchen, 12 ml, steril	*Greiner*
Cellstar® Zellkulturplatte 24 Well, steril	*Greiner*
Glasfiberfilter	*Wollac*
Einmalpipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	*Becton Dickinson Labware*
Pipetten 10 µl, 100 µl, 1000 µl	*Eppendorf*
NUNCLON TM 96 Well Zellkulturplatte	*Nalge Nunc International*
BD Falcon TM 5 ml Rundbodenröhrchen, Polystyrol	*BD Biosciences*
Zentrifuge Rotixa	*Hettich*
Centrifuge 5810	*Eppendorf*
Neubauer-Zählkammer	*Assistent*
Fluoreszenmikroskop	*Ernst Leitz*
CO2-Brutschrank	*Forma Scientific*

LKB Wallac 1205 Betaplate® Liquid Scintillation Counter	
SKATRON Combi Cell Harvester	

2.3 Methoden

2.3.1 Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMCs)

Per Butterfly wurde den Probanden venöses Blut (120 ml) entnommen und die Gerinnung durch Zugabe von Heparin (25 IE / ml) unterbunden. Im Anschluss fand eine zeitnahe Untersuchung der Zellen statt. Jeweils 30 ml des heparinisierten Blutes wurden zusammen mit 5 ml HBSS in Blaukopfröhrchen (50 ml) gegeben und anschließend auf 15 ml Biocoll separating solution in einem zweiten Blaukopfröhrchen überschichtet. Anschließend wurden diese für 30 min bei 740 g zentrifugiert. Dabei entstand zwischen Plasma und der Trennmediumschicht, eine Grenzschicht mit peripher mononukleären Zellen (PBMCs), den Lympho- und Monozyten. Die Grenzschicht wurde kreisförmig abgenommen, in ein weiteres Blaukopfröhrchen gegeben und mit HBSS auf 50 ml aufgefüllt. Erneut wurde für 10 min und 370 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und erneut mit HBSS auf 25 ml aufgefüllt. Wieder wurde für 10 min bei 370 g zentrifugiert und im Anschluss der Überstand verworfen. Das Zellsediment wurde mit 1 ml RPMI 1640 Medium pro 10 ml Blut resuspendiert.

2.3.2 Zellzahl Bestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 20 µl der Zellsuspension mit 180 µl Acridin-Orange vermengt und in einer Neubauer- Zählkammer überführt. Bei 16-facher Vergrößerung wurden 4 Quadranten à 16 Felder ausgezählt. Die Zellzahl in Mio. / ml erhielt man, indem man den Durchschnitt der 4 Quadranten durch 10 dividierte. Die Zellzahlkonzentration wurde bei jedem Ansatz mit RPMI 1640 Medium auf 1 Million Zellen pro Milliliter eingestellt.

2.3.3 Antigenzugabe

Die Lymphozyten wurden mit verschiedenen Antigenen in unterschiedlicher Konzentration, einer Positivkontrolle und einer Negativkontrolle stimuliert. Als Negativkontrolle wurde das Nährmedium RPMI 1640 und als Positivkontrolle wurde poke weed mitogen (PWM) verwendet. PWM führt zu einer unspezifischen Aktivierung sowohl der B- als auch der T-Zellen.

Als Antigen, welches vorwiegend Makrophagen stimuliert, wurde das Trockensubstrat des Tuberkuloseimpfstoffes Bacillus Calmette-Guérin (BCG) in 4 verschiedenen Konzentrationsstufen verwendet. Dazu wurde eine Flasche in 10 ml RPMI resuspendiert und für 15 min in ein Ultraschallbad gestellt. Im Anschluss wurden folgende Konzentrationsstufen hergestellt und verwendet:

BCG 50	$5x10^8$ Einheiten BCG (500 µl BCG-Suspension + 500 µl RPMI 1640)
BCG 5	$5x10^7$ Einheiten BCG (50 µl BCG-Suspension + 500 µl RPMI 1640)
BCG 0,5	$5x10^6$ Einheiten BCG (5 µl BCG-Suspension + 500 µl RPMI 1640)
BCG 0,05	$5x10^5$ Einheiten BCG (0,5 µl BCG-Suspension + 500 µl RPMI 1640)

Das zweite Antigen wurde aus Tetanus Toxoid (Tet) in 3 Konzentrationen hergestellt.

TET 8	8 IE Tetanol / ml RPMI
TET 0,8	0,8 IE Tetanol / ml RPMI
TET 0,08	0,08 IE Tetanol / ml RPMI

Bei im Verlauf mangelnder Verfügbarkeit wurde auf boostrix (btx) zurückgegriffen. Sowohl btx als auch Tet aktivieren vorwiegend den T_H2-Weg.

btx 2	btx 2 IE / ml (0,5 ml btx + 4,5 ml RPMI)
btx 0,2	btx 0,2 IE / ml (0,05 ml btx + 4,5 ml RPMI)

Das dritte Antigen, Tuberculin purified protein derivative (PPD), stimuliert vorwiegend T_H1-Zellen und wurde in 2 Konzentrationen verwandt. Hier wurde die käuflich erworbene Lösung mit 2 T.E. / 0,1ml genutzt.

PPD 20	PPD 20 TE / 1ml RPMI
PPD 2	PPD 2 TE / 1 ml RPMI

Das 4. Antigen ist die Topoisomerase I (Scl70). Sie zählt zu den extrahierbaren nukleären Antigenen. Antikörper gegen die Topoisomerase I, sog. anti-Scl-70 Antikörper sind vorwiegend bei diffus kutaner Systemischer Sklerose zu finden. Scl70 wurde in folgenden 5 Konzentrationsstufen verwendet.

Scl70 (100)	100 μg Scl70 / ml RPMI
Scl70 (10)	10 μg Scl70 / ml RPMI
Scl70 (1)	1 μg Scl70 / ml RPMI
Scl70 (0,1)	0,1 μg Scl70 / ml RPMI
Scl70 (0,01)	0,01 μg Scl70 / ml RPMI

2.3.4 Proliferationsansatz

Im Proliferationsansatz wurde die Proliferation der Lymphozyten auf Antigenreizung untersucht. Hierzu wurde in einer 96-Well-Platte 150 μl Zellsuspension + 50 μl Antigen je Well suspendiert. Es wurden 4 Well je Antigenkonzentration, 8 Well für die Negativkontrolle und 3 Well für die Positivkontrolle angesetzt. Der Ansatz wurde für 7 Tage bei 37° Celsius und 5% CO_2 inkubiert. 16 Stunden vor Kulturende wurde der Ansatz mit radioaktiv markiertem ^{3}H-Thymidin (0,74 MBq / ml, 20 μl / Well) beimpft, nach Ende der Inkubationszeit mit dem SKATRON Combi Cell Harvester geerntet und die radioaktiv markierten Zellen auf Filtermatten übertragen. Im Anschluss erfolgte eine mindestens 2-stündige Trocknung. Die Filtermatten wurden mit einer Schutzfolie überzogen und in Szintillationsflüssigkeit (ULTIMA Gold) getränkt. Im LKB Wallac 1205 Betaplate® Liquid Scintillation Counter wurde die von den

markierten Zellen ausgehende β-Strahlung gemessen. Die kalkulierte Zählrate (ccpm) wurde gemessen und diente als Maß für die Proliferation. Um bei unterschiedlicher Spontanproliferation einen vergleichbaren Wert zu erhalten, wurde der Stimulationsindex (SI) berechnet. Dieser errechnet sich aus der Division des Mittelwertes der Zellkulturzählraten mit Antigenstimulation bzw. Positivkontrolle und des Mittelwertes der Zellkulturzählraten ohne Antigenstimulation (Negativkontrolle).

2.3.5 Zytokinexpressionsuntersuchung der peripheren mononukleären Blutzellen

Um die Zytokin-Produktion auf Antigenreizung in den PBMC-Überständen zu bestimmen, wurden verschiedene Ansätze erstellt. Hierzu wurde in einer 24-Well- Platte 1200 µl Zellsuspension und 400 µl Antigen je Well suspendiert. Dabei wurde 1 Well je Antigenkonzentration, 1 Well für die Positivkontrolle und 1 Well für die Negativkontrolle angesetzt. Bei 37°C und 5% CO_2 erfolgte für 7 Tage die Inkubation. Hiernach wurde der flüssige Überstand abpipettiert und bei -20°C eingefroren. Die Mikrotiterplatten wurden mit monoklonalem mouse-anti-human Zytokin-Antikörper beschichtet, welcher als sog. „capture antibody“ dienen sollte. Dieser wurde nach Herstellerangaben in Bicarbonat Puffer verdünnt und auf 96-Well Mikrotiterplatten à 100 µl aufgetragen. Die so beschichteten Platten wurden über Nacht im Kühlschrank inkubiert, anschließend 3-mal mit Waschpuffer, bestehend aus PBS-Puffer und BSA, gewaschen und nach dem letzten Waschvorgang für eine Stunde bei Raumtemperatur im Waschpuffer stehen gelassen. Im Anschluss wurden die Platten mit je 75 µl pro Well der zu untersuchenden Kulturüberstände beschichtet und im Brutschrank erneut bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Um Vergleichswerte bei der anschließenden photometrischen Bestimmung zu haben, wurden auf jeder Platte Standardverdünnungsreihen in 8 Konzentrationen aufgetragen. Es erfolgte ein erneuter 3-maliger Waschgang. Hiernach wurden 100 µl biotinylierte Antikörpersuspension pro Well hinzugegeben, welcher als sog. „detection antibody“ diente. Im Anschluss an eine 90-minütige Inkubation im Brutschrank,

schloss sich wieder ein 3-maliger Waschgang an, bei dem 25 µl Avidin-gekoppelte Peroxidase (2,5 µg / ml Waschpuffer) zugegeben wurde. Es wurde erneut für 40 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert und hiernach 150 µl Substratlösung (0,5 mg O-Phenylendiamin / ml Citratpuffer) pro Well zugeführt. Mittels 25% -iger Schwefelsäure wurde die einsetzende, farbliche Reaktion abgestoppt. Die Extinktion der Reaktion wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm in einem ELISA Reader gemessen. Die Auswertung erfolgte mittels Easy Fit, indem die gemessene Extinktion der Ansätze in Relation zu den Extinktionen der Standardverdünnungsreihen gesetzt und in pg / ml, für das jeweils zu messende Zytokin, angegeben wurde.

2.3.6 Definition Messzeitpunkte

Die Patienten wurden zu verschiedenen Messzeitpunkten (T) vor und nach Stammzelltransplantation von einem Rheumatologen in der rheumatologischen Ambulanz der Universitätsklinik Tübingen untersucht. Hier wurde neben der Erhebung des mRSS auch die Blutuntersuchungen für die erwähnten Proliferations- und Zytokinexpressionsuntersuchung durchgeführt. Nach Stammzelltransplantation wurden die Patienten im ersten Halbjahr zunächst vierteljährlich untersucht. Hiernach wurde die Untersuchung auf ein halbjährliches Intervall ausgedehnt wurde. Der gesamte Untersuchungszeitraum nach HSCT betrug 3 Jahre. In Kapitel 3.2.2 wurden in einer Unteranalyse zusätzliche Messzeitpunkte definiert. V0 gilt hier als Zeitpunkt vor HSCT. V1 als Zeitpunkt nach HSCT. V1 lag dabei in einer Spanne von 2-26 Monate. In der Betrachtung des mRSS in Kapitel 3.4 erfolgten Erhebungen des Scores an zwei Untersuchungszeitpunkten (U) vor HSCT, zum einen 3 Monate (U-3) und unmittelbar vor HSCT (U0). Die Untersuchungszeitpunkte nach HSCT stimmen mit den Messzeitpunkten T der oben erwähnten immunologischen Tests überein, d.h. hier wurde ebenfalls im ersten Halbjahr nach HSCT vierteljährlich und hiernach halbjährlich bis zum Ende des Beobachtungszeitraums von 3 Jahren untersucht.

2.3.7 Statistik

Nach experimenteller Erhebung der Daten wurden diese digitalisiert und mittels Microsoft Excel (Version 16.84) geordnet. Im Anschluss fanden mehrere statistische Auswertungen mittels SPSS Statistics von IBM (Version 29.0.0.0 (241)) statt. Neben einer deskriptiven Beschreibung der Daten anhand von Mittelwert, Median und Standardabweichung wurden die einzelnen Messzeitpunkte anhand nichtparametrischer Mittelwertvergleiche auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht. Aufgrund der Tatsache, dass nicht von allen 33 Patienten zu jedem Messzeitpunkt Daten vorliegen, wurde sowohl auf abhängige als auch auf unabhängige Mittelwertvergleiche zurückgegriffen. So wurden in Kapitel 3.2 und 3.3 statistisch signifikante Unterschiede in der Antigen-stimulierten Proliferation und Zytokinexpression der PBMCs nach HSCT verglichen mit dem Vortransplantationszeitraum per Kruskal-Wallis Test analysiert. Als Ausnahme hiervon wurde in Kapitel 3.2.2 bei rein abhängigen Daten der Wilcoxon-Test verwandt. Statistisch signifikante Unterschiede im mRSS (Kapitel 3.4) wurden bei annähernder Normalverteilung mittels t-Test analysiert. Ein *p*-Wert von $p < 0.05$ galt bei allen Tests als statistisch signifikant. Wurden mehrere Messzeitpunktvergleiche durchgeführt, so wurde das Signifikanzniveau um Bonferroni korrigiert, um eine Alpha Fehler Kumulierung, d.h. eine fälschliche Ablehnung der Nullhypothese zu vermeiden. Umfasste eine Stichprobe weniger als 25 Probanden, wurde die exakte Signifikanz betrachtet (Harris and Hardin, 2013).

2.3.8 Definition T_H1- und T_H2-Typ

Darüber hinaus wurden die Probanden anhand ihres Zytokinmusters in einen T_H1- oder T_H2-Typ bzw. einen Mischtyp zu unterschieden. In Anlehnung an vorherige Arbeiten von Barth et al. (2003, 2002) haben wir einen T_H1-Typ definiert als positive TNF-β und/ oder IFN-γ Produktion nach Stimulation mit PPD aber keine Produktion auf Stimulation mit Tet. Ein T_H2-Typ zeigte im Gegensatz hierzu eine positive IL-5 und/ oder IL-13 Produktion auf Stimulation mit Tet aber keine Produktion auf Stimulation mit PPD. Patienten, die keine Produktion auf

Stimulation oder nach o.g. Definition einen T_H1- und T_H2-Typ zeigten, wurden als Mischtyp („T_H0“) charakterisiert. Vereinfacht wurde von einer positiven Produktion ausgegangen, wenn diese über den, in der Zytokinuntersuchung ermittelten, Normwerten lag. Die Normwerte als auch o.g. Definitionen sind für eine bessere Übersicht nochmal in der folgenden *Tabelle 11* aufgeführt (Barth et al., 2003, Barth et al., 2002).

Tabelle 11: Definition und Normwerte der T_H-Typen

T_H1-Typ	T_H2-Typ	T_H0-Typ
Definition: TNF-β oder IFN-γ Produktion auf PPD-Stimulation aber keine Produktion auf Tet	Definition: IL-5 oder IL-13 Produktion auf Tet Stimulation, aber keine Produktion auf PPD	Definition: Keine Produktion über Normwerte oder Erfüllung der T_H1 und T_H2 Definition
Normwerte: TNF-β: 78 pg / ml IFN-γ: 1250 pg / ml	Normwerte: IL-5: 470 pg / ml IL-13: 313 pg / ml	Normwerte: Siehe T_H1 und T_H2 Normwerte

2.3.9 Definition Responder / Non-Responder / Relapse anhand des mRSS

Zudem wurde der mRSS als klinischer Parameter betrachtet (Khanna et al., 2017). Probanden, die ein 25% Absinken des mRSS gegenüber U(0) an drei aufeinander folgenden Untersuchungen zeigten, wurden in dieser Arbeit als Responder klassifiziert. Der Rest wurde als Non-Responder gewertet. Probanden, die ein 25% Absinken des mRSS gegenüber U(0) an 3 aufeinander folgenden Untersuchungen, aber hiernach wieder einen Anstieg des mRSS auf weniger als 25% des Ausgangswertes aufwiesen, wurden als Patienten mit Relapse klassifiziert.

2.3.10 Definition Endpunkte

Als primären Endpunkt definierten wir eine Reduktion der T_H2 Polarisierung, gemessen als eine statistisch signifikante Abnahme ($p < 0.05$) der T_H-2 Antigen-stimulierten Proliferation- und / oder Zytokinexpression nach HSCT gegenüber dem Vortransplantationszeitraum. Als sekundären Endpunkt einen Wechsel des T_H2-Typs nach Transplantation gegenüber dem Vortransplantationszeitraum, gemessen anhand eines zuvor definierten Zytokinmusters der PBMCs auf entsprechende T_H1- bzw. T_H2-Antigenstimulation. Ferner wurde als explorativer Endpunkt Veränderungen im mRSS und T_H-Typ im direkten Vergleich für verschiedene Subgruppen unseres Patientenkollektivs untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Es wurden im Rahmen der AST MOMA Studie zwischen 2012 und 2020 35 SSc Patienten einer HSCT unterzogen. Davon waren 22 Probanden männlich und 13 weiblich (*Tabelle 12*). Das Durchschnittsalter bei Erstdiagnosestellung betrug 40 Jahre. 29 Monate vergingen im Durchschnitt zwischen Erstdiagnosestellung und HSCT, wobei die Spanne hier von 4-77 Monate reichte. Das Durchschnittsalter bei HSCT betrug 43 Jahre mit einem durchschnittlichen mRSS von 29. Die folgende *Tabelle 12* bildet die genannten Daten ab.

Tabelle 12: Probandenkollektiv AST MOMA Studie

		Mittelwert	*Median*	*Maximum*	*Minimum*	*Spannweite*
Gesamt (n=35)	Alter bei Erstdiagnose (Jahre)	40	38	58	21	37
	Dauer Erstdiagnose bis HSCT (Monate)	29	24	77	4	73
	Alter bei HSCT (Jahre)	43	42	61	24	37
	mRSS bei HSCT	29	31	46	4	42
Männlich (n=22)	Alter bei Erstdiagnose (Jahre)	39	38	58	21	37
	Dauer Erstdiagnose bis HSCT (Monate)	25	20	64	4	60
	Alter bei HSCT (Jahre)	41	40	61	24	37
	mRSS bei HSCT	28	30	46	4	42
Weiblich (n=13)	Alter bei Erstdiagnose (Jahre)	42	38	57	23	34
	Dauer Erstdiagnose bis HSCT (Monate)	35	25	77	12	65
	Alter bei HSCT (Jahre)	45	42	61	27	34
	mRSS bei HSCT	30	37	40	13	27

Von 2 männlichen Probanden liegen keine Lymphozytentransformationstests (LTT) vor, sodass sich unser nachfolgend analysiertes Probandenkollektiv aus 33 Probanden, von denen mindestens eine LTT-Untersuchung vor oder nach HSCT vorliegt, zusammensetzt.

3.2 Ergebnisse Proliferationsansatz

3.2.1 Messzeitpunktvergleich T0 versus T1 und Folgende der Proliferationsanalyse

In den nachfolgenden Diagrammen ist der Mittelwert der Antigen- (BCG, Tet, PPD, Scl70) stimulierten Proliferation in Abhängigkeit des Messzeitpunktes aufgetragen. Der Mittelwert wird durch die Balkenhöhe symbolisiert. Zudem sind Standardabweichung und Median angegeben. T0 ist dabei definiert als jeder Zeitpunkt vor HSCT. Im ersten Halbjahr nach HSCT war eine vierteljährliche Untersuchung geplant, die hiernach auf ein halbjährliches Intervall ausgedehnt wurde. Der gesamte Untersuchungszeitraum nach HSCT betrug drei Jahre. Es wurde der Kruskal Wallis Test durchgeführt. Statistisch signifikante Ergebnisse im Messzeitpunktvergleich mit T0, d.h. dem Zeitpunkt vor HSCT, sind mit einem * markiert. Ein Signifikanzniveau von ($p< 0.05$) mit entsprechender Bonferroni Korrektur gilt dabei als statistisch signifikant.

In der BCG stimulierten Proliferation in *Abbildung 3* zeigt sich eine Zunahme des Mittelwerts im ersten Jahr (Messzeitpunkt T1-T3) nach HSCT gegenüber dem Zeitpunkt vor Transplantation. Allerdings nimmt auch die Standardabweichung im genannten Zeitraum zu. Zum Messzeitpunkt T4 (1,5 Jahre nach HSCT) und nachfolgend sind deskriptiv ein Absinken des Mittelwertes und eine Abnahme der Standardabweichung zu beobachten. Die beschriebenen Veränderungen sind jedoch nicht statistisch signifikant.

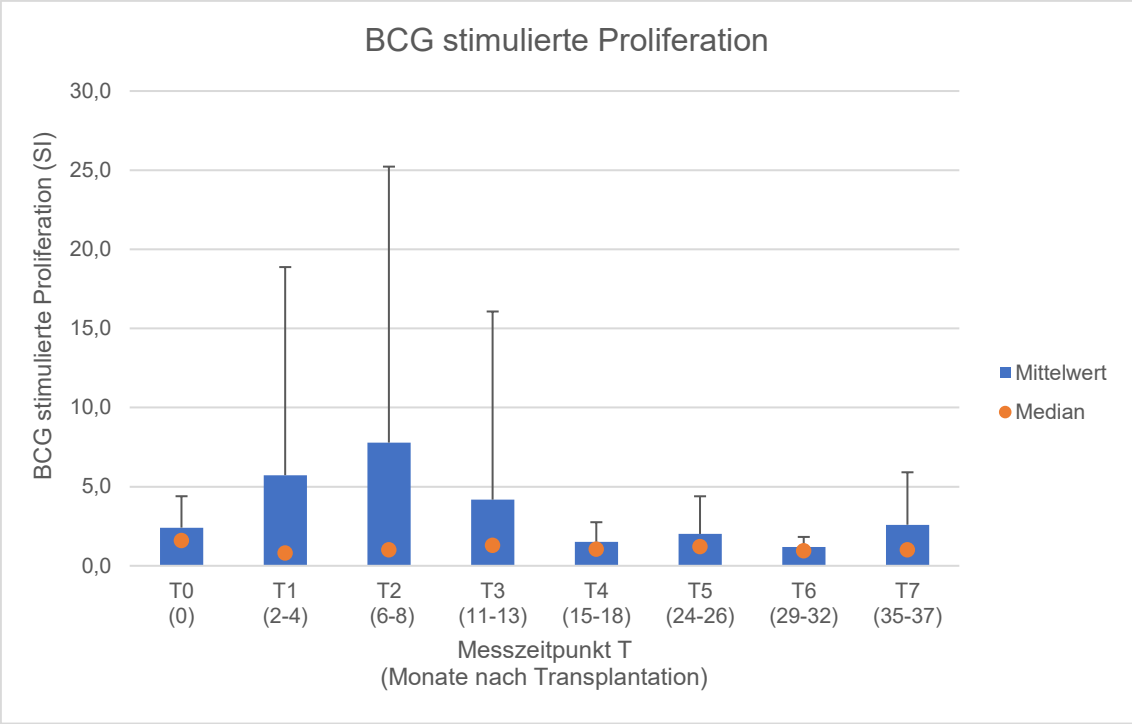

*Abbildung 3: Bacillus Calmette-Guérin (BCG) stimulierte Proliferation (SI) je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar. Um Bonferroni korrigierte, statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.05 / 7$) im Messzeitpunktvergleich mit T0 sind mit * markiert.*

Betrachtet man die Tetanus-stimulierte Proliferation in Abbildung 4, so zeigt sich eine statistisch signifikante Abnahme zu den Messzeitpunkten T1, T2 und T3, d.h. im ersten Jahr nach HSCT gegenüber T0. Dieser Effekt ist ab dem Messzeitpunt T4 nicht mehr statistisch signifikant.

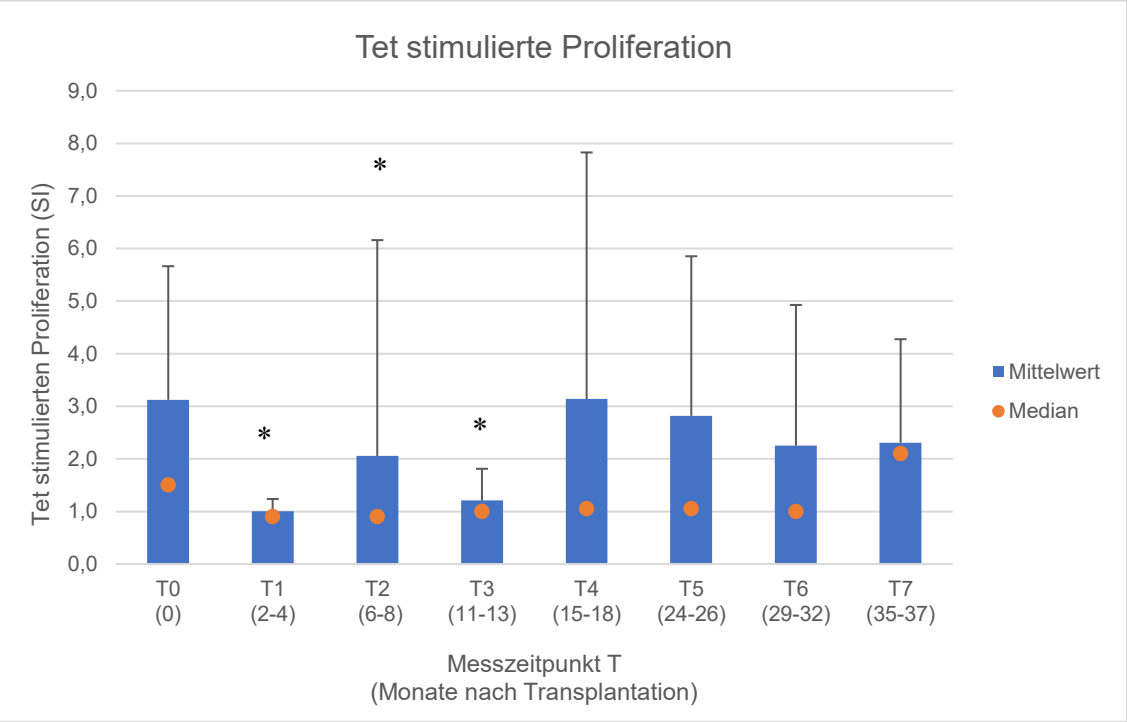

Abbildung 4: Tetanol (Tet) stimulierte Proliferation (SI) je Messzeitpunkt (T).
*Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar. Um Bonferroni korrigierte, statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.05 / 7$) im Messzeitpunktvergleich mit T0 sind mit * markiert.*

In der PPD stimulierten Proliferation in *Abbildung 5* zeigen sich keine statistisch signifikanten Änderungen im Vergleich der Messzeitpunkte nach HSCT mit T0. Zum Messzeitpunkt T2 ist allenfalls eine Zunahme von Mittelwert und Standardabweichung zu verzeichnen, die nachfolgend jedoch wieder abnimmt.

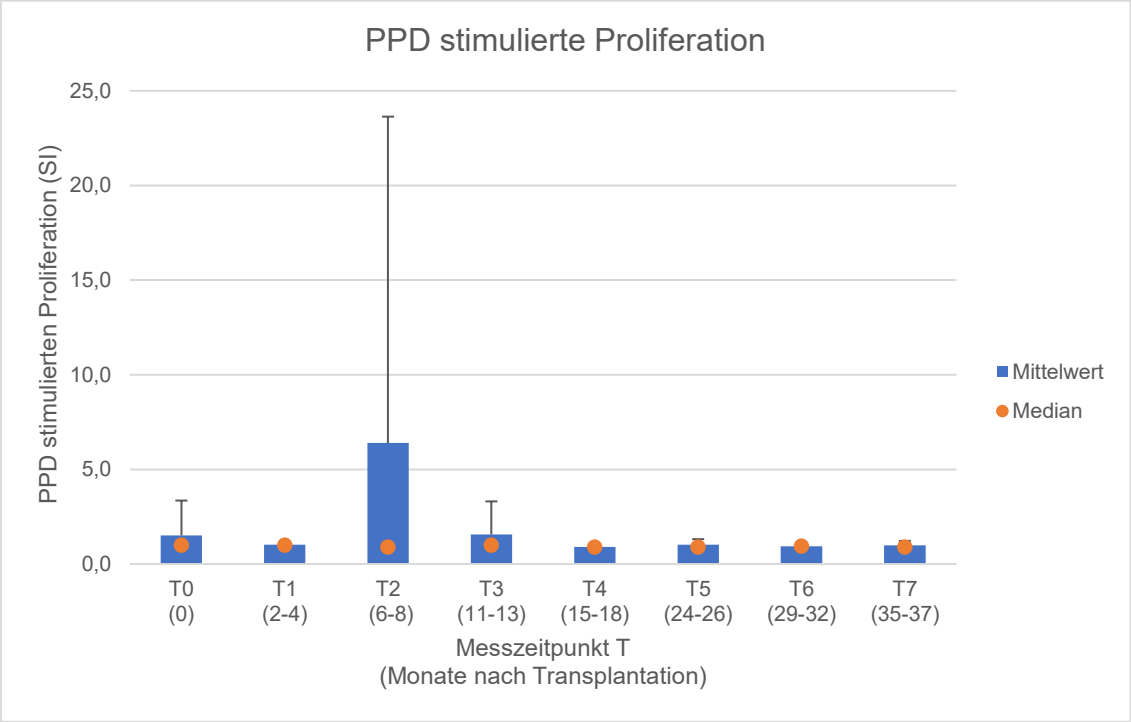

*Abbildung 5: purified protein derivative (PPD) stimulierte Proliferation (SI) je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar. Um Bonferroni korrigierte, statistisch signifikante Unterschiede (p< 0.05 / 7) im Messzeitpunktvergleich mit T0 sind mit * markiert.*

In *Abbildung 6* der Scl70-stimulierten Proliferation zeigt sich eine statistisch signifikante Abnahme zu den Messzeitpunkten T1, T4 und T5 verglichen mit T0. Allgemein ist eine Abnahme des Mittelwerts nach HSCT zu erkennen.

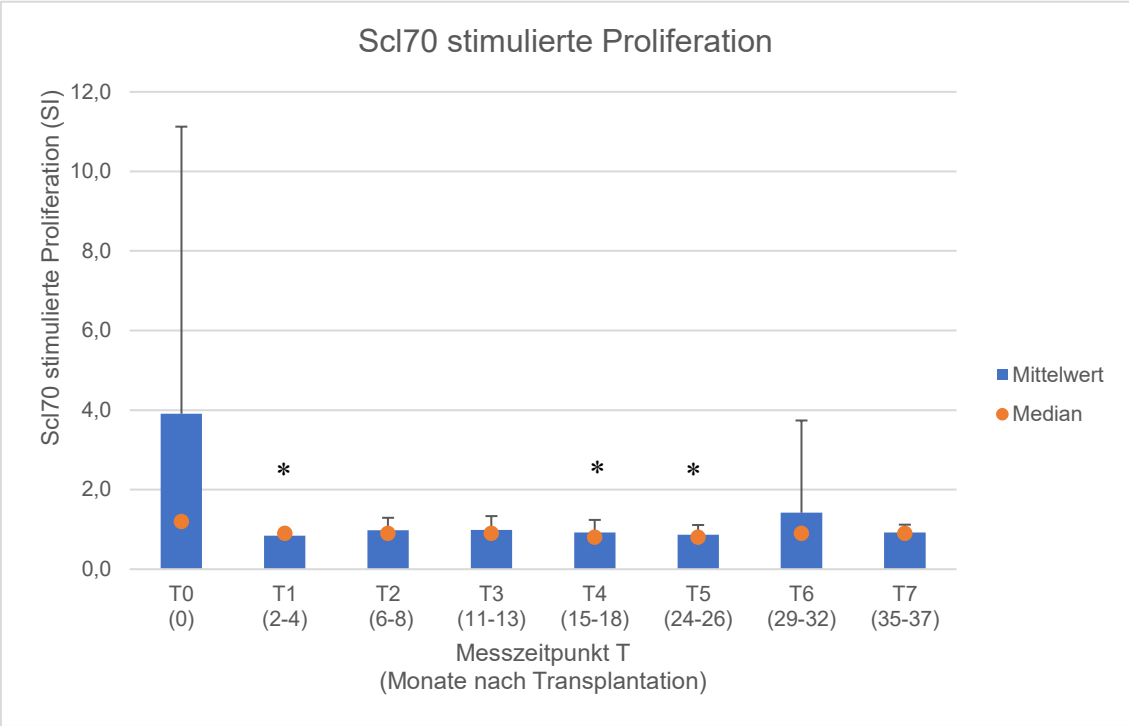

*Abbildung 6: Topoisomerase I (Scl70) stimulierte Proliferation (SI) je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar. Um Bonferroni korrigierte, statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.05 / 7$) im Messzeitpunktvergleich mit T0 sind mit * markiert.*

3.2.2 Ergebnisse V0 versus V1 der Proliferationsanalyse

Aus dem Kollektiv lagen von 15 Patienten Proliferationsdaten vor (V0) und nach (V1) HSCT vor. Der individuell früheste Zeitpunkt der 15 Probanden nach HSCT (V1) liegt dabei in einer Spanne zwischen 2-26 Monate. Vergleicht man per Wilcoxon Test den Mittelwert des Messzeitpunktes V0 mit V1 für alle 15 Probanden, so zeigt sich eine signifikante Abnahme der Tet ($p < .001$) und Scl70 ($p = .016$) stimulierten Proliferation. Die PPD ($p = .360$) und BCG ($p = .117$) stimulierte Proliferation zeigen keine signifikanten Änderungen. Im Folgenden ist der Mittelwert und die Standardabweichung für die mit dem jeweiligen Antigen stimulierte Proliferation zu den Messzeitpunkten V0 und V1 anhand eines Balkendiagramms angegeben. Signifikante Veränderungen ($p < .05$) gegenüber V0 sind mit * markiert.

Zu beobachten ist eine nicht signifikante Abnahme des Mittelwerts der BCG stimulierten Proliferation zum Messzeitpunkt V1 gegenüber V0 (*Abbildung 7*). Hingegen ist eine signifikante Abnahme der Tet stimulierten Proliferation ($p < .001$) zum Messzeitpunkt V1 gegenüber dem Zeitpunkt V0 zu verzeichnen, wie in *Abbildung 8* dargestellt. Der Mittelwert der PPD stimulierten Proliferation nimmt nicht signifikant zum Messzeitpunkt V1 gegenüber V0 ab (*Abbildung 9).* Betrachtet man die Scl70 stimulierte Proliferation, findet sich erneut eine signifikante Abnahme ($p = .016$) des Mittelwerts des Messzeitpunktes V1 gegenüber V0 (*Abbildung 10*).

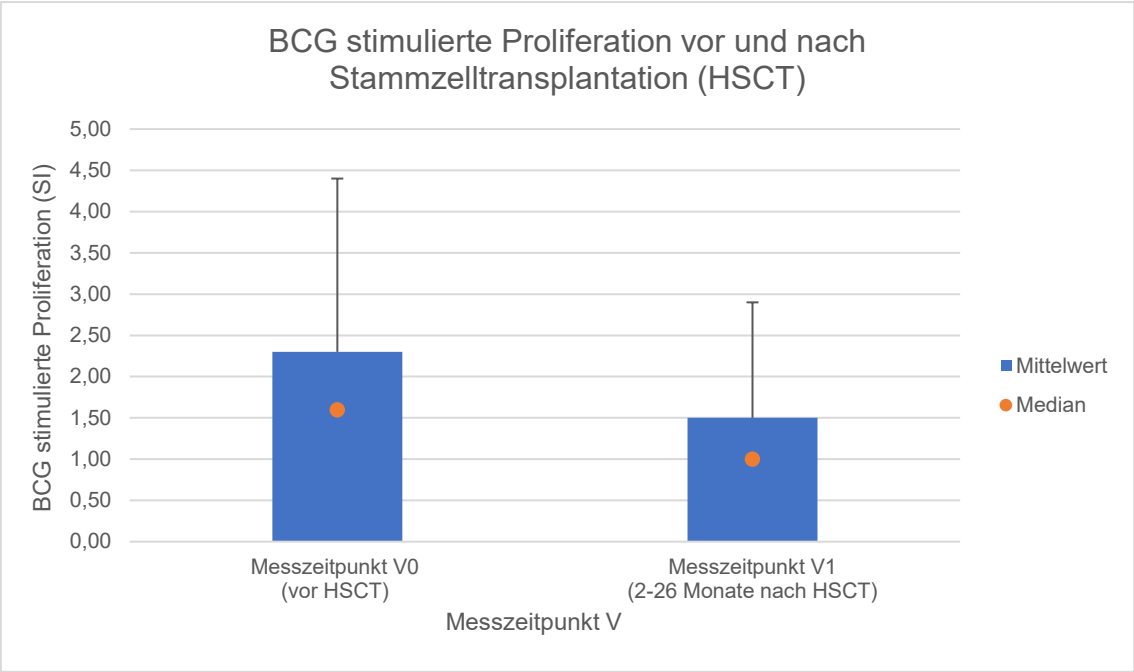

*Abbildung 7: Bacillus Calmette-Guérin (BCG) stimulierte Proliferation vor (V0) und individuell frühestem Zeitpunkt nach (V1) hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) im Messzeitpunktvergleich mit T0 sind mit * markiert.*

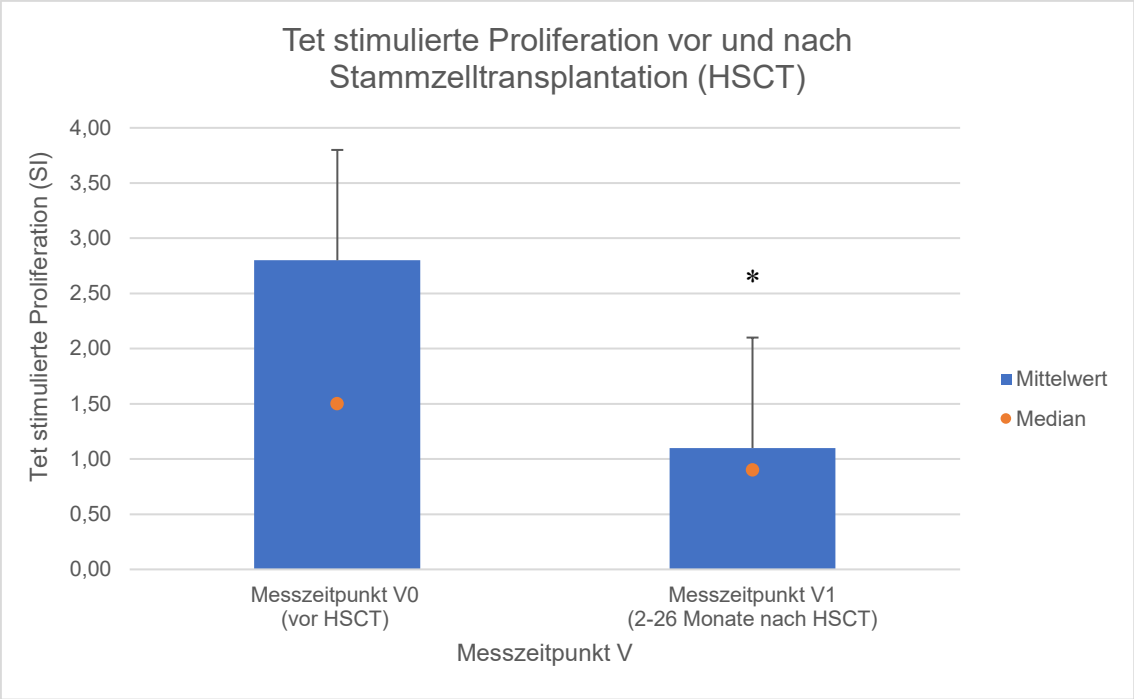

Abbildung 8: Tetanol (Tet) stimulierte Proliferation vor (V0) und individuell frühestem Zeitpunkt nach (V1) hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT).
*Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) im Messzeitpunktvergleich mit T0 sind mit * markiert.*

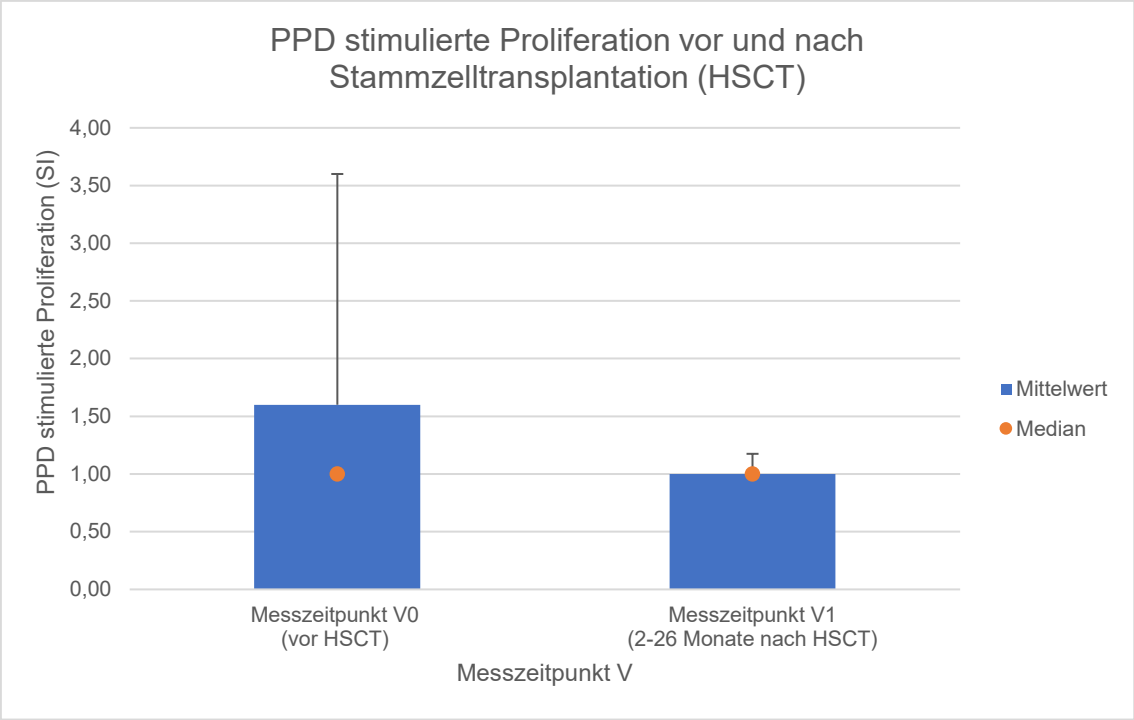

*Abbildung 9: purified protein derivative (PPD) stimulierte Proliferation vor (V0) und individuell frühestem Zeitpunkt nach (V1) hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar. Statistisch signifikante Unterschiede (p< 0.05) im Messzeitpunktvergleich mit T0 sind mit * markiert.*

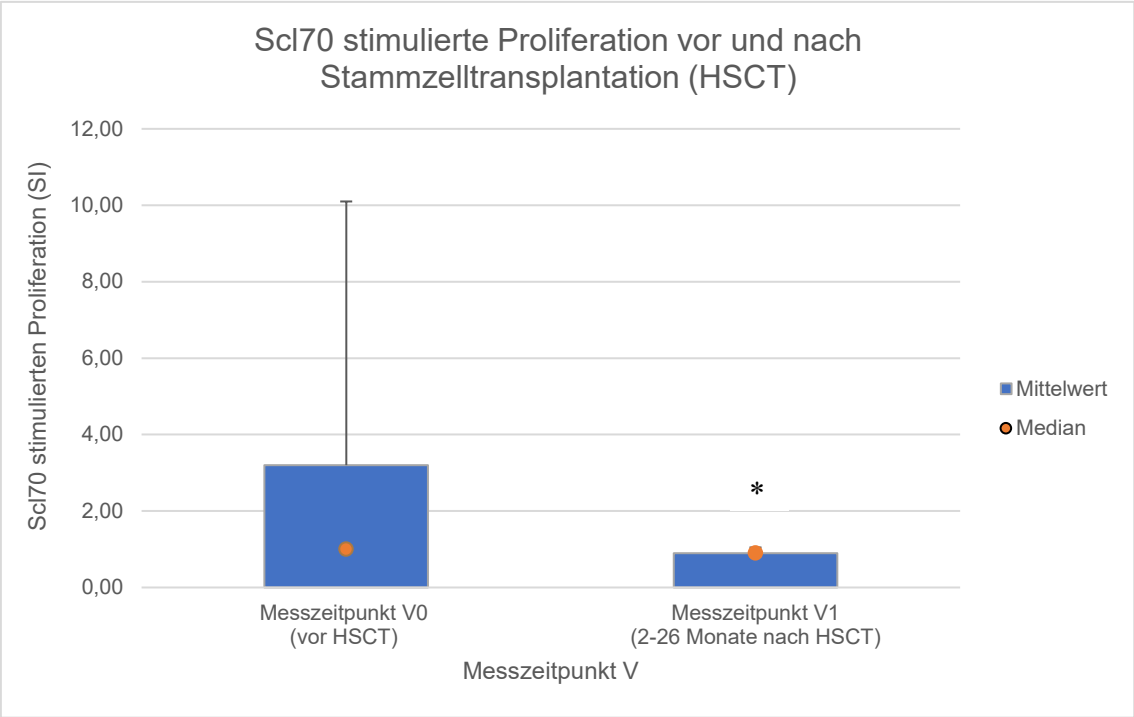

Abbildung 10: Topoisomerase I (Scl70) stimulierte Proliferation vor (V0) und individuell frühestem Zeitpunkt nach (V1) hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT).
*Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar. Statistisch signifikante Unterschiede (p< 0.05) im Messzeitpunktvergleich mit T0 sind mit * markiert.*

3.3 Ergebnisse Zytokinexpressionsanalyse

3.3.1 Messzeitpunktvergleich T0 versus T1 und Folgende der Zytokinexpressionsanalyse

In der Zytokinexpressionsanalyse sollte ebenfalls der Frage nachgegangen werden, ob sich die Antigen-stimulierte Zytokinproduktion signifikant in den Messzeitpunkten unterscheidet. Es wurden zehn verschiedene Zytokine gemessen, die jeweils mit den vier genannten Antigenen stimuliert wurden. Es wurde wieder ein unabhängiger Mittelwertvergleich in Form des Kruskal Wallis Test gewählt. Statistisch signifikante Änderungen ($p < .05$) im globalen Signifikanzniveau sind jeweils oberhalb der Diagramme in Klammern angegeben. Zudem wurden die Messzeitpunkte nach HSCT mit dem Messzeitpunkt T0 vor HSCT paarweise verglichen. Um Bonferroni korrigierte Werte von $p < .05$ galten dabei als statistisch signifikant und wurden mit * im Diagramm markiert. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt. Der Mittelwert wird durch die Balkenhöhe symbolisiert. Zudem sind die Standardabweichung in Fehlerbalken und der Median angegeben.

3.3.1.1 T_H2-Zytokine (IL-5 und IL-13)

Betrachtet man die Zytokine IL-5 und IL-13, die v.a. den T_H2-Weg repräsentieren, so zeigt sich im globalen Signifikanzniveau der Tet stimulierten IL-5 Produktion eine signifikante Veränderung über die einzelnen Messzeitpunkte *($p < .01$)*. Auffällig ist in der in *Abbildung 12* gezeigten Tet stimulierten IL-5 Produktion die Abnahme des Mittelwerts zu den Messzeitpunkten T1, T2 und T3, d.h. ca. 1 Jahr nach HSCT gegenüber T0, auch wenn diese Veränderung um Bonferroni korrigiert, statistisch nicht signifikant ist.

Die BCG ($p = .566$), PPD ($p = .519$) und Scl70 ($p = .517$) stimulierte IL-5 Produktion ergeben keine statistisch signifikanten Veränderungen (*Abbildungen 11, 13, 14*).

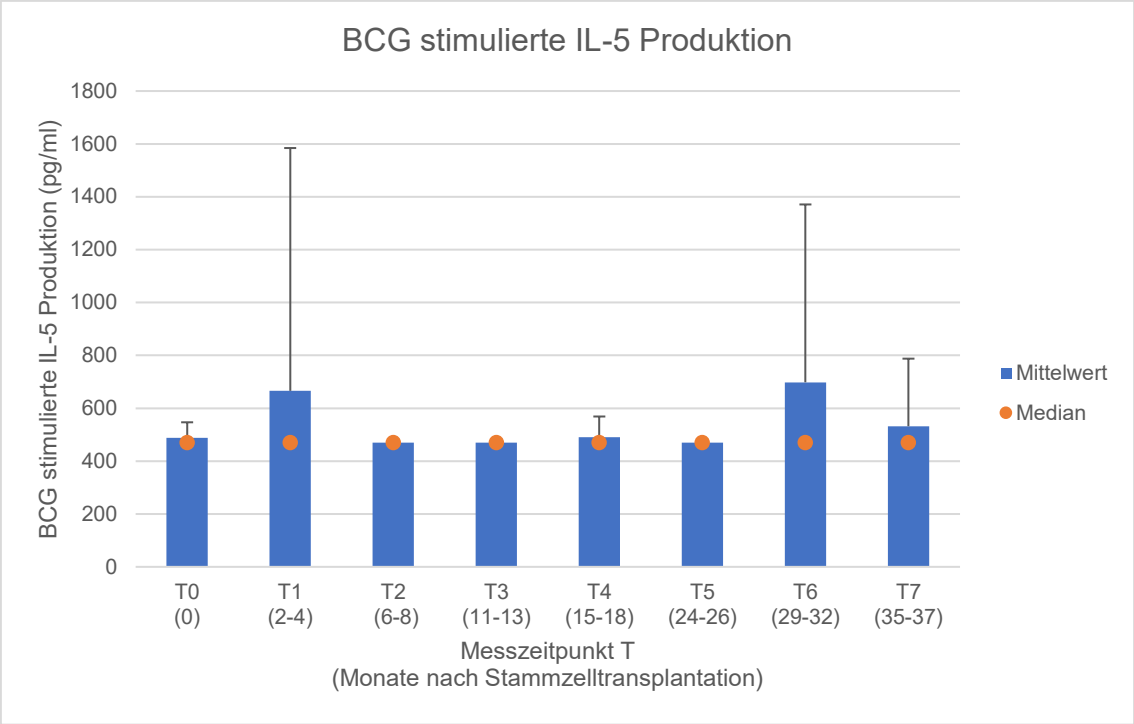

Abbildung 11: Bacillus Calmette-Guérin (BCG) stimulierte IL-5 Produktion je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

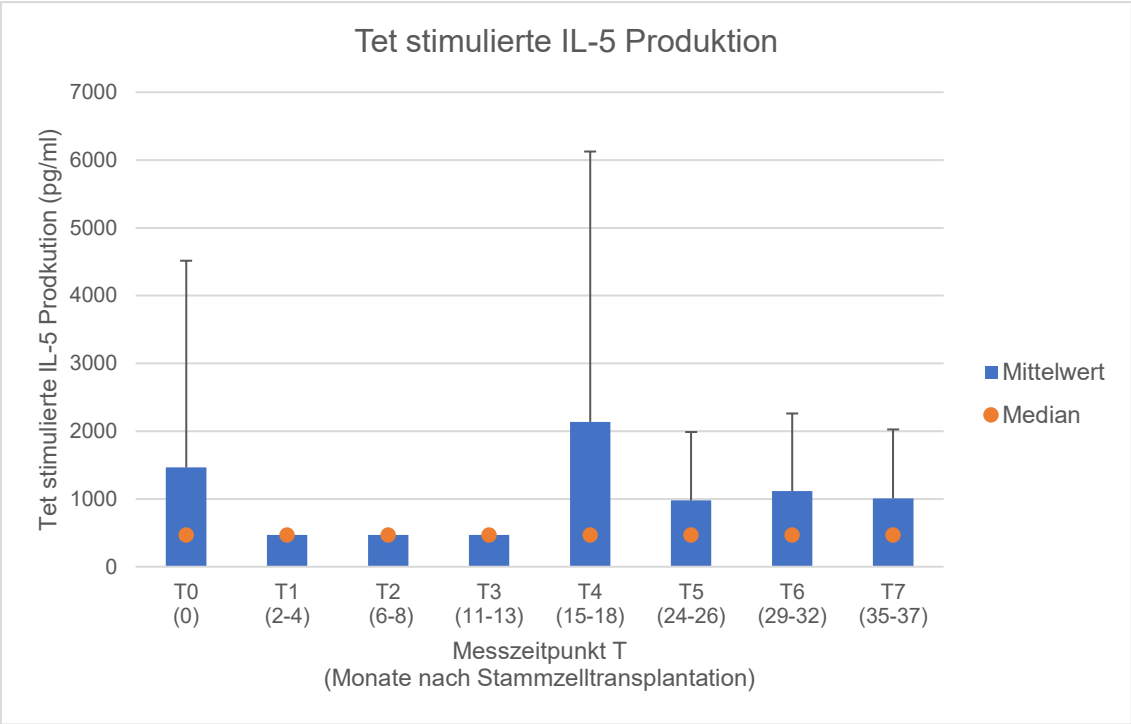

Abbildung 12: Tetanol (Tet) stimulierte IL-5 Produktion je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

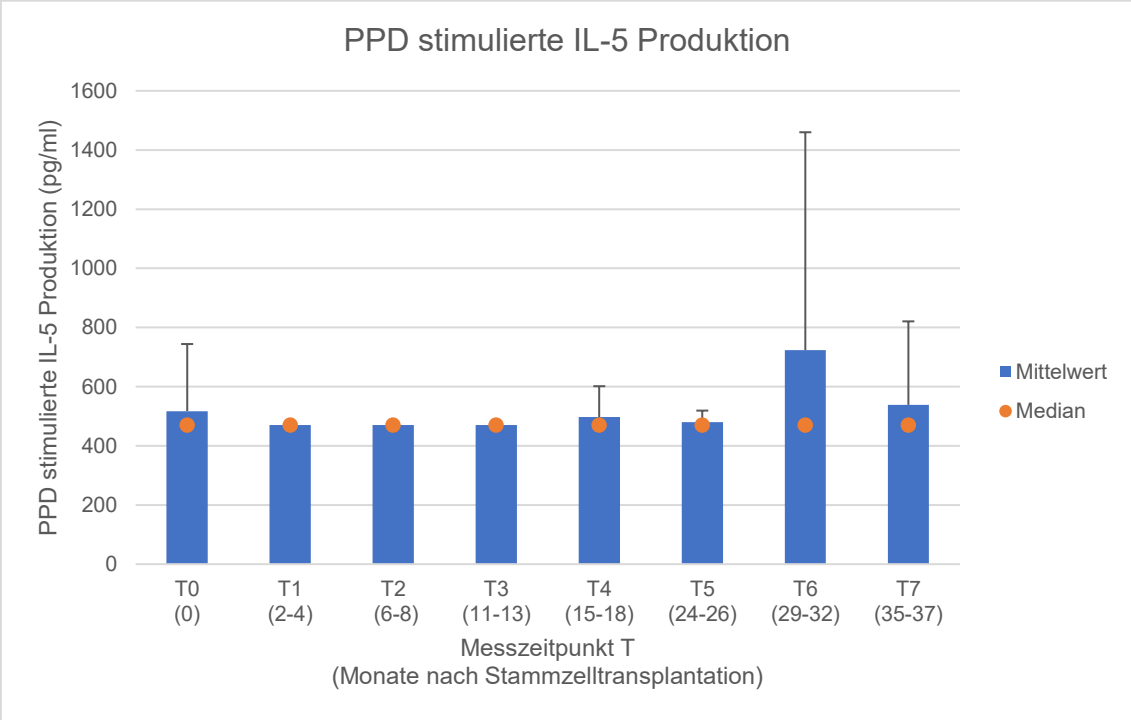

Abbildung 13: purified protein derivative (PPD) stimulierte IL-5 Produktion je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

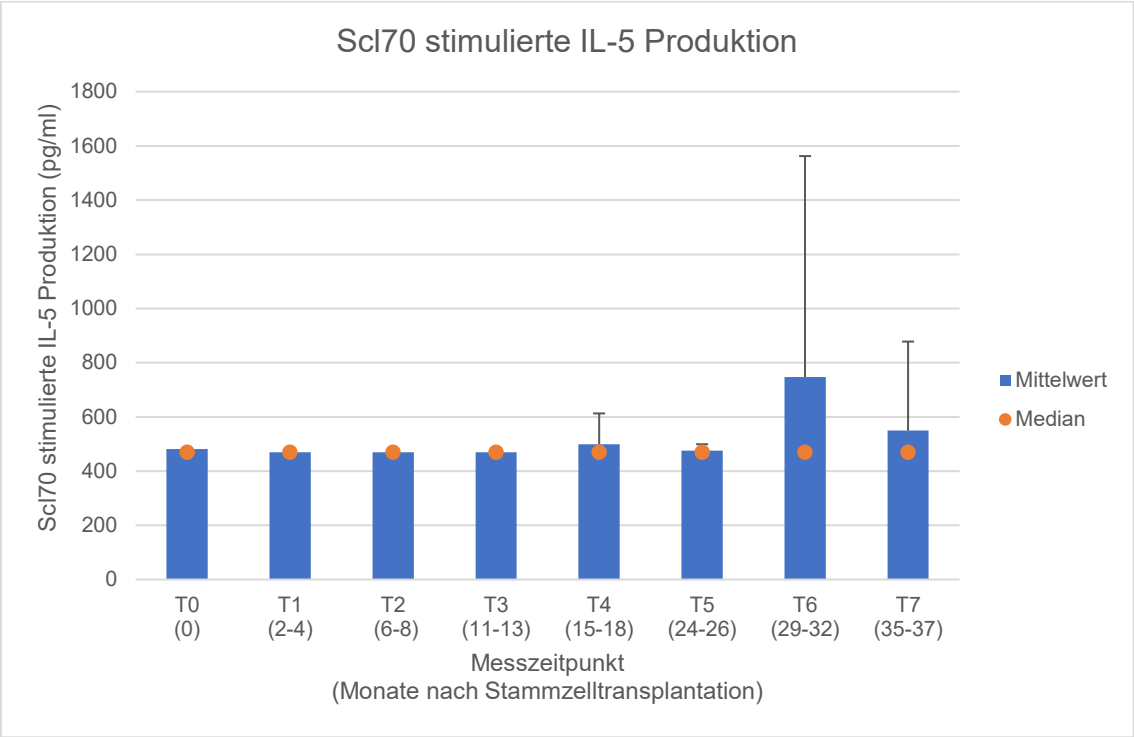

Abbildung 14: Topoisomerase I (Scl70) stimulierte IL-5 Produktion je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

In der BCG (*p*= .768*; Abbildung 15*), PPD (*p*= .679*; Abbildung 17*), Scl70 (*p*= .763; *Abbildung 18*) aber auch der Tet (*p*= .090; *Abbildung 16*) stimulierten IL-13 Produktion zeigten sich keine statistisch signifikanten Veränderungen.

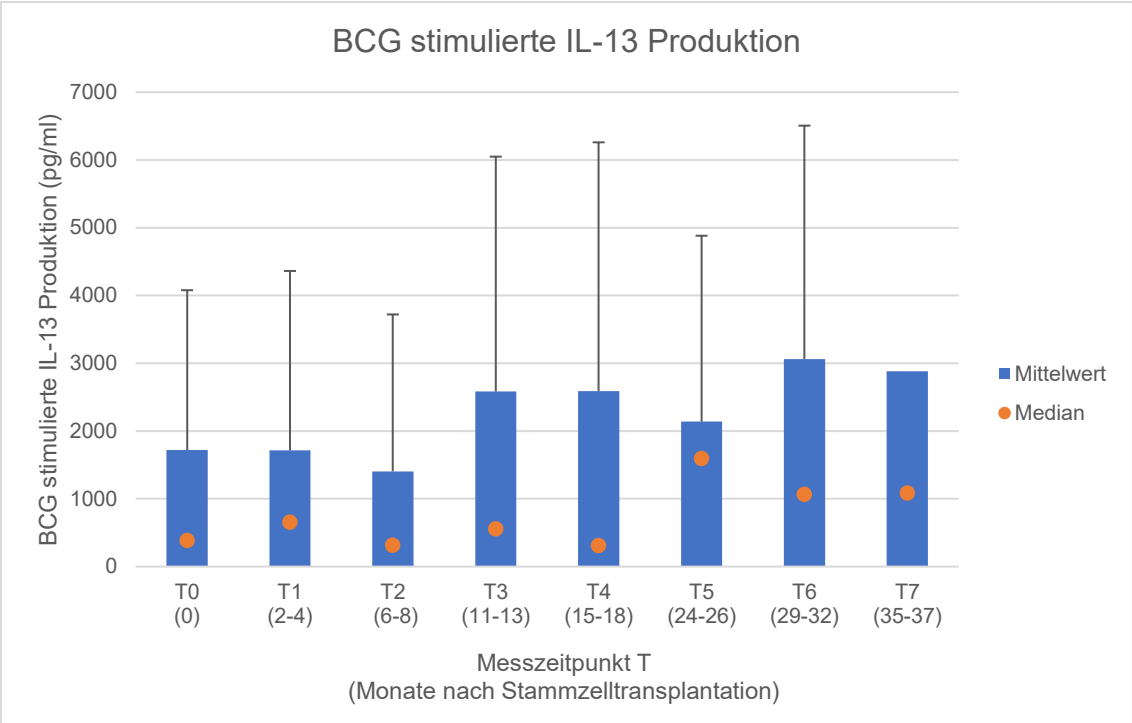

Abbildung 15: Bacillus Calmette-Guérin (BCG) stimulierte IL-13 Produktion je Messzeitpunkt (T).
Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

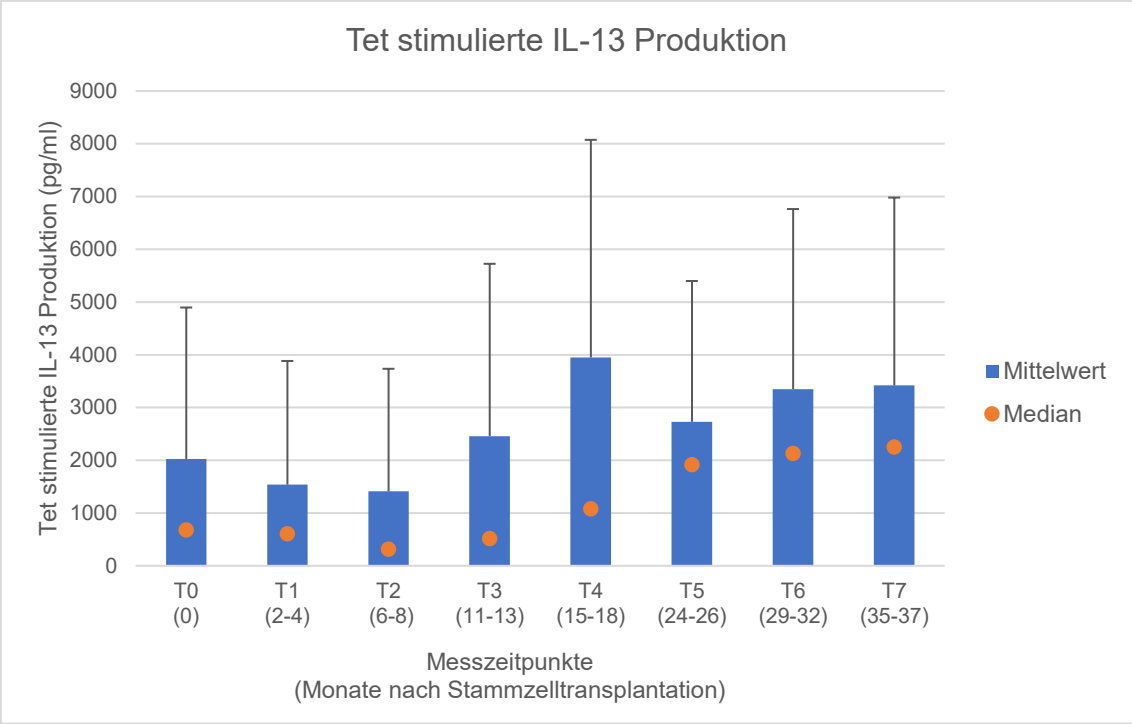

Abbildung 16: Tetanol (Tet) stimulierte IL-13 Produktion je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

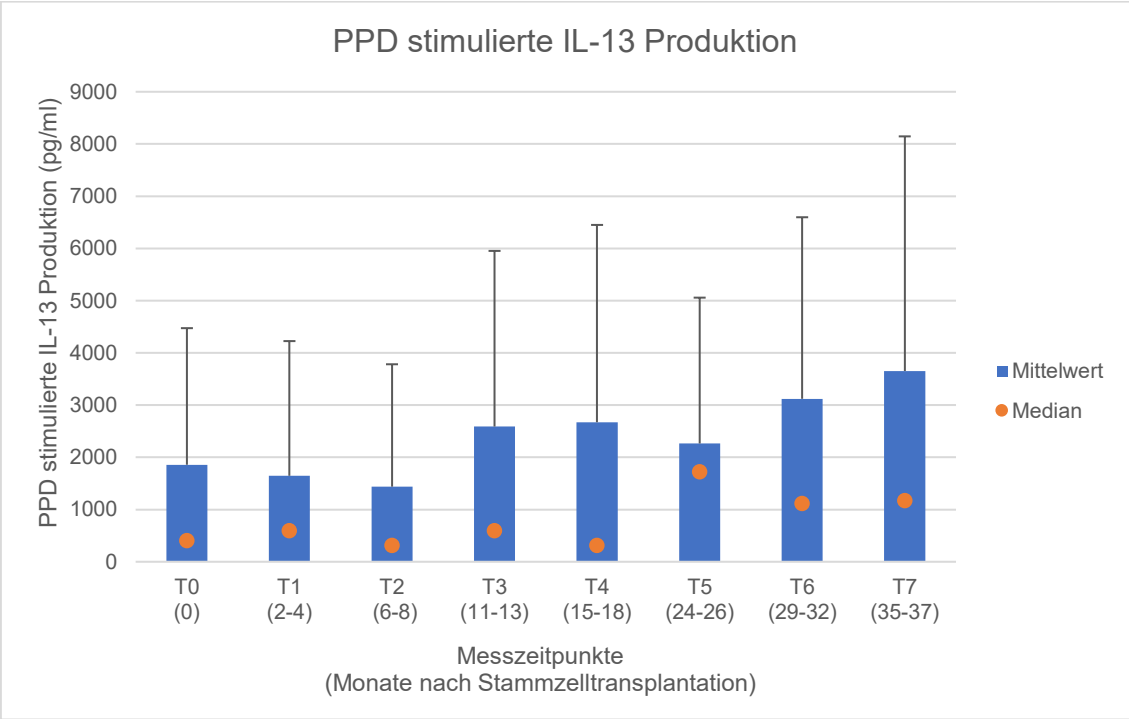

Abbildung 17: purified protein derivative (PPD) stimulierte IL-13 Produktion je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

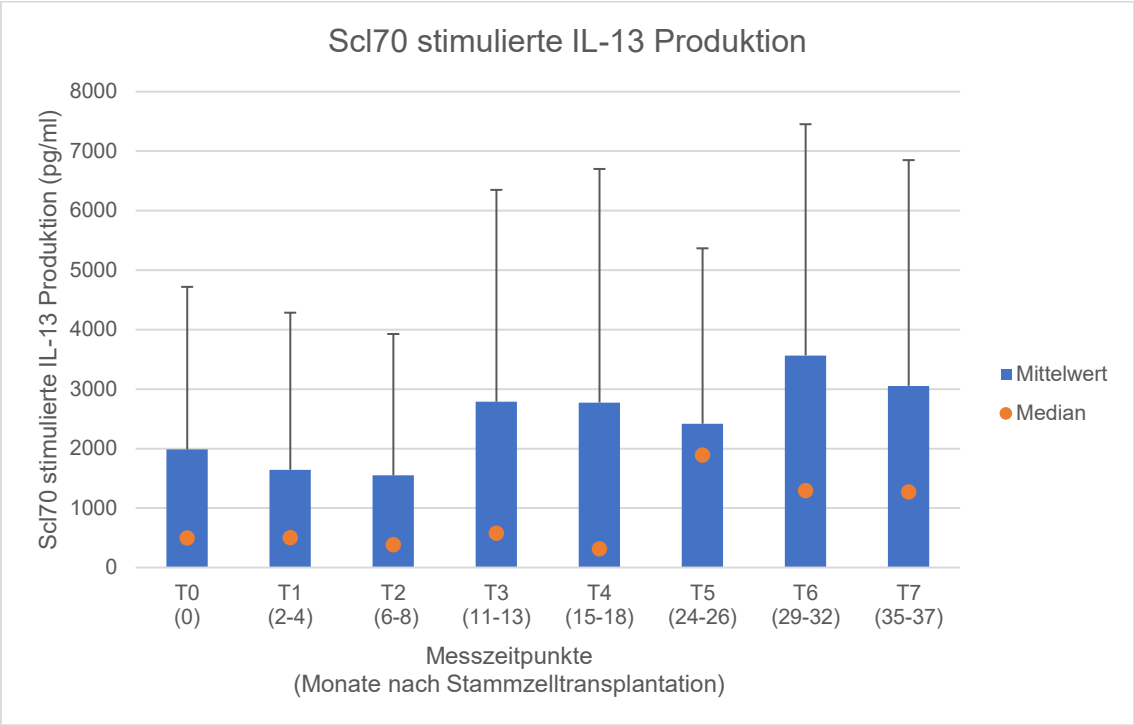

Abbildung 18: Topoisomerase I (Scl70) stimulierte IL-13 Produktion je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

3.3.1.2 T_H1-Zytokine (IFN-γ und TNF-β)

Neben den Zytokinen, die den T_H2-Weg repräsentieren, wurden auch solche gemessen, die stellvertretend für den T_H1-Weg stehen, wie z.B. IFN-γ und TNF-β. In der nachfolgend gezeigten IFN-γ Produktion zeigte sich weder unter der Stimulierung mit BCG (*p*= .647), Tet (*p*= .393), PPD (*p*= .368) oder Scl70 (*p*= .251) eine statistisch signifikante Veränderung (*Abbildungen 19* bis *22*).

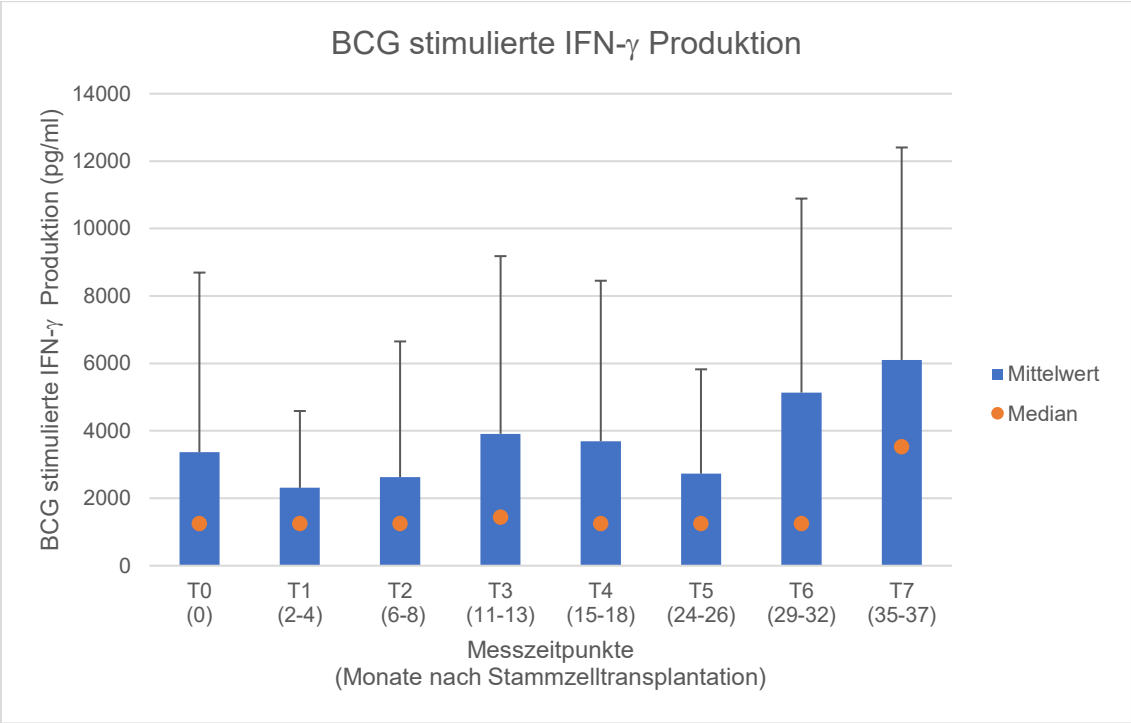

Abbildung 19: Bacillus Calmette-Guérin (BCG) stimulierte IFN-γ Produktion je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

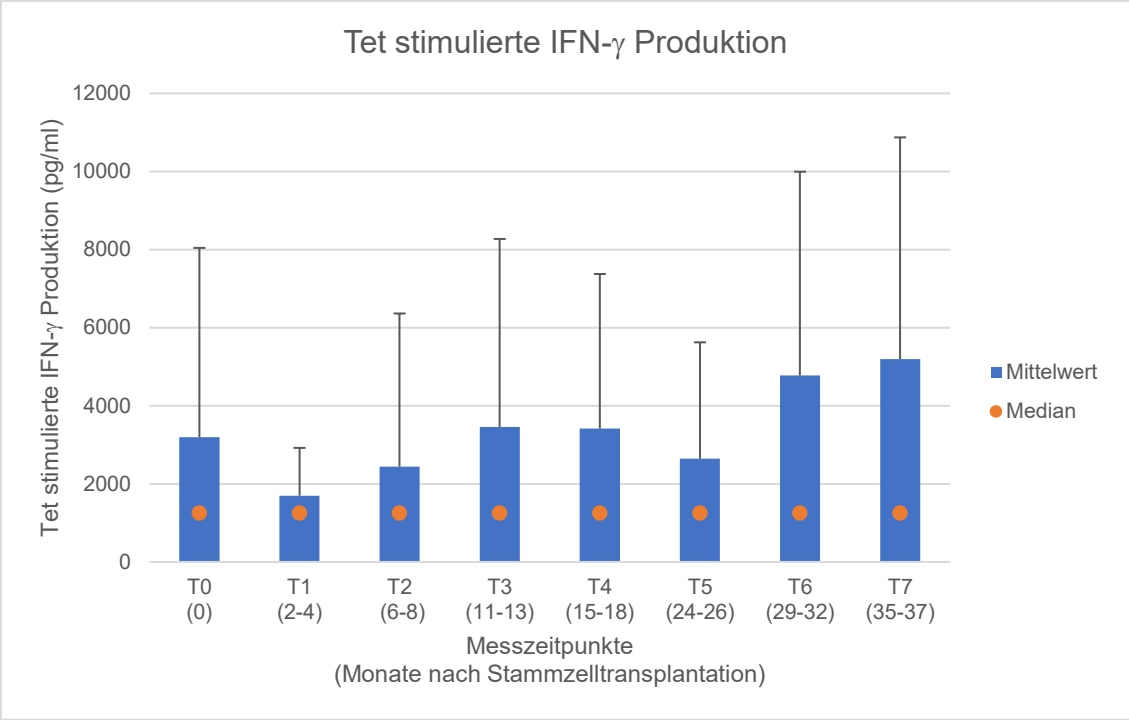

Abbildung 20: Tetanol (Tet) stimulierte IFN-γ Produktion je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

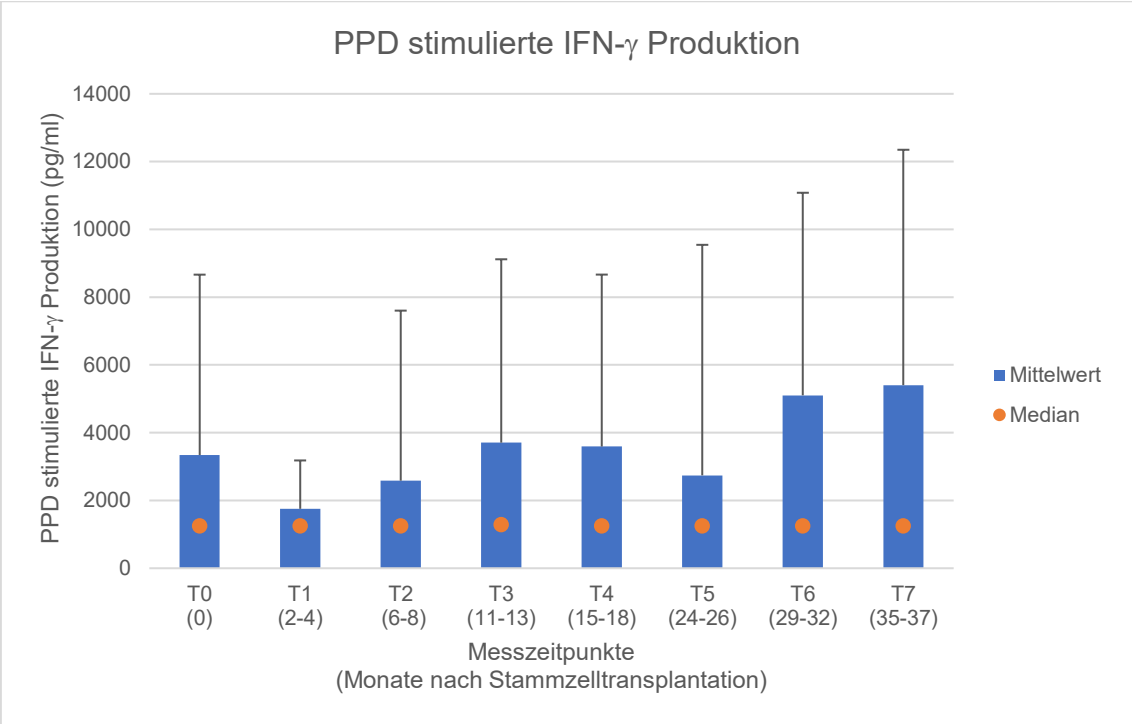

Abbildung 21: purified protein derivative (PPD) stimulierte IFN-γ Produktion je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

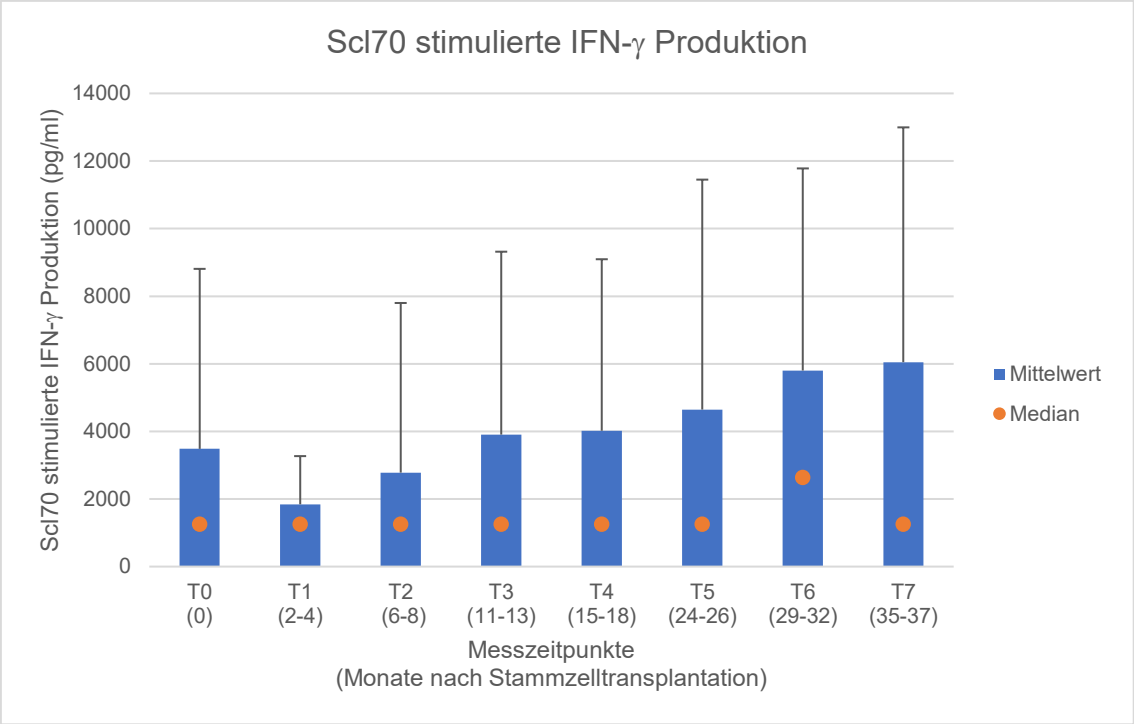

Abbildung 22: Topoisomerase I (Scl70) stimulierte IFN-γ Produktion je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

Auch die TNF-β Produktion wies unter Stimulierung mit BCG (*p*= .631), Tet (*p*= .295), PPD (*p*= .748) und Scl70 (*p*= .627) keine statistisch signifikanten Veränderungen auf (*Abbildungen 23 bis 26*).

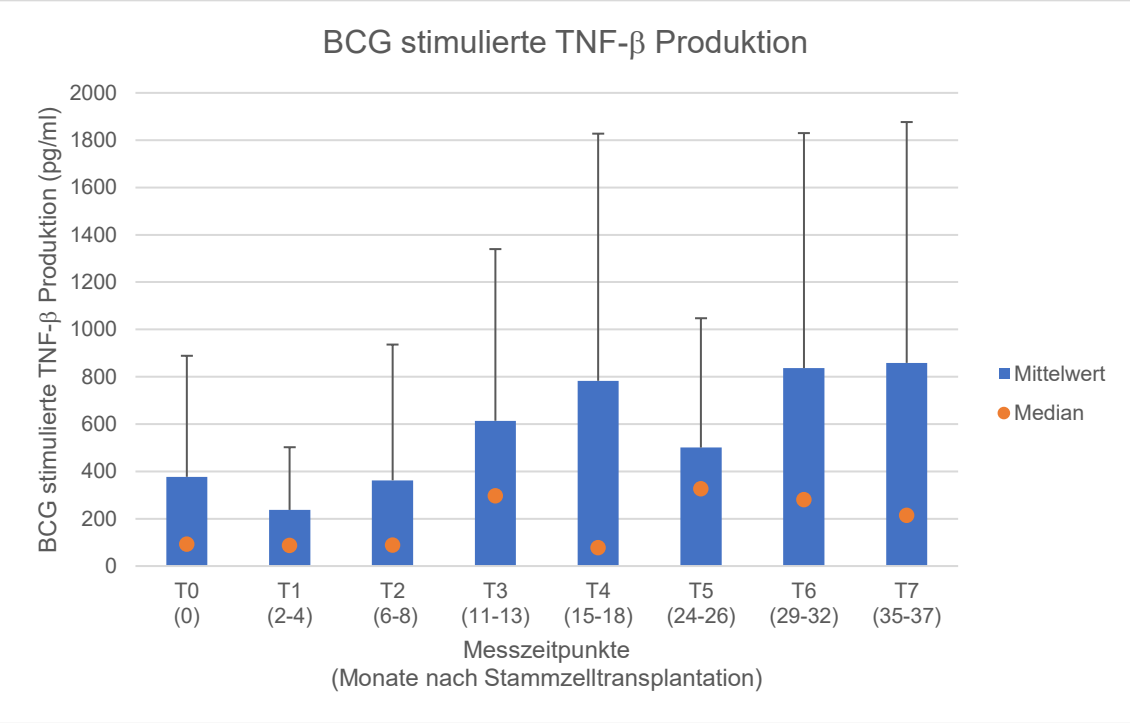

Abbildung 23: Bacillus Calmette-Guèrin (BCG) stimulierte TNF-β Produktion je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

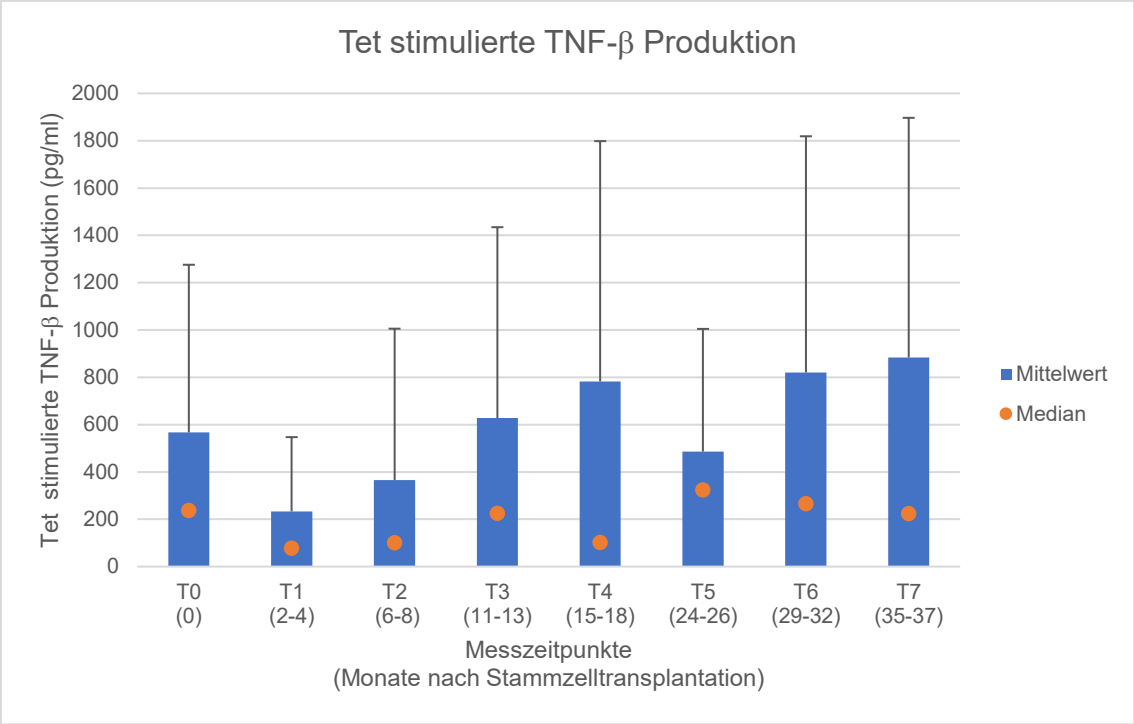

Abbildung 24: Tetanol (Tet) stimulierte TNF-β Produktion je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

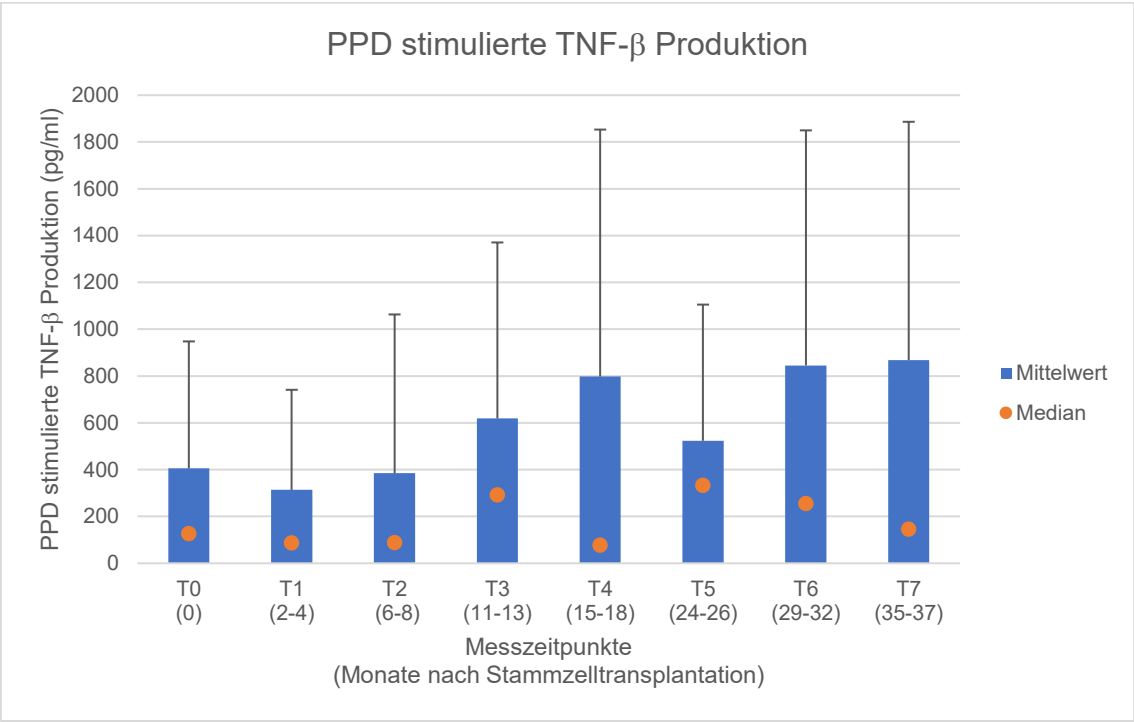

Abbildung 25: purified protein derivative (PPD) stimulierte TNF-β Produktion je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

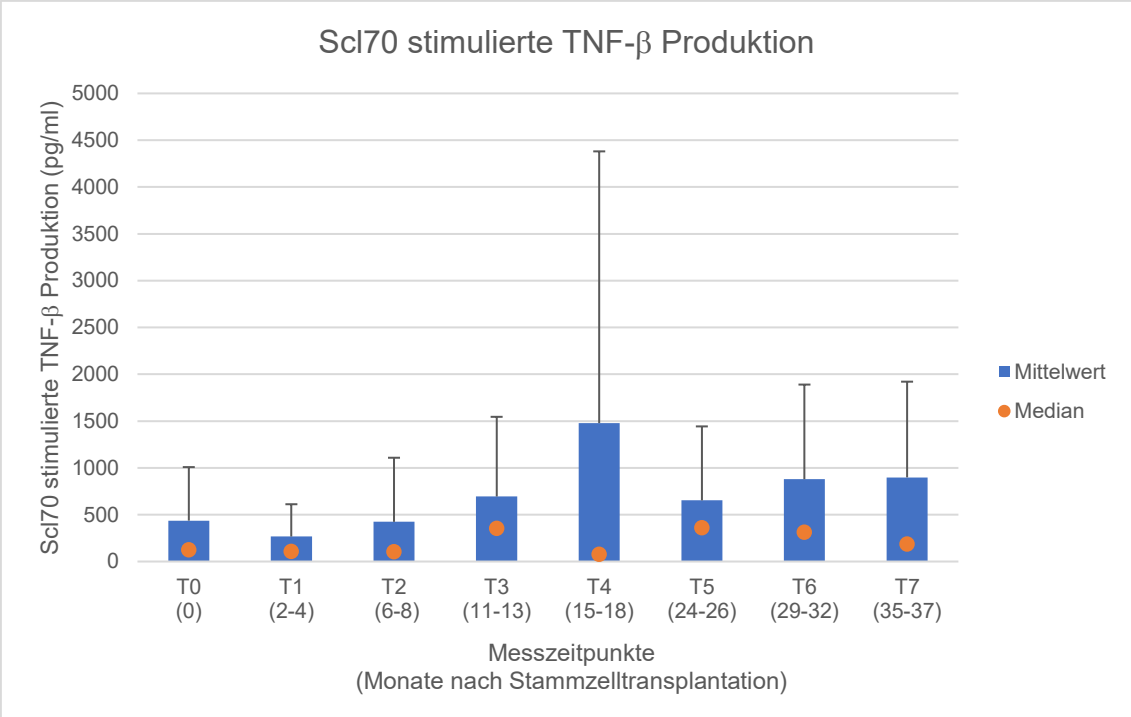

Abbildung 26: Topoisomerase I (Scl70) stimulierte TNF-β Produktion je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

3.3.1.3 Proinflammatorische Zytokine (IL-1α, IL-6, IL-17, TNF-α)

Neben den zuvor analysierten „T_H1“ und „T_H2“- Zytokinen wurden auch IL-1α, IL-6, IL-17 und TNF-α gemessen, die proinflammatorisch wirken. IL-1α zeigte auf Antigenstimulation keine signifikante Änderung (BCG: *p*= .233; Tet: *p*= .697; PPD: *p*= .540; Scl70: *p*= .533), wie in den *Abbildungen 27* bis *30* dargestellt ist.

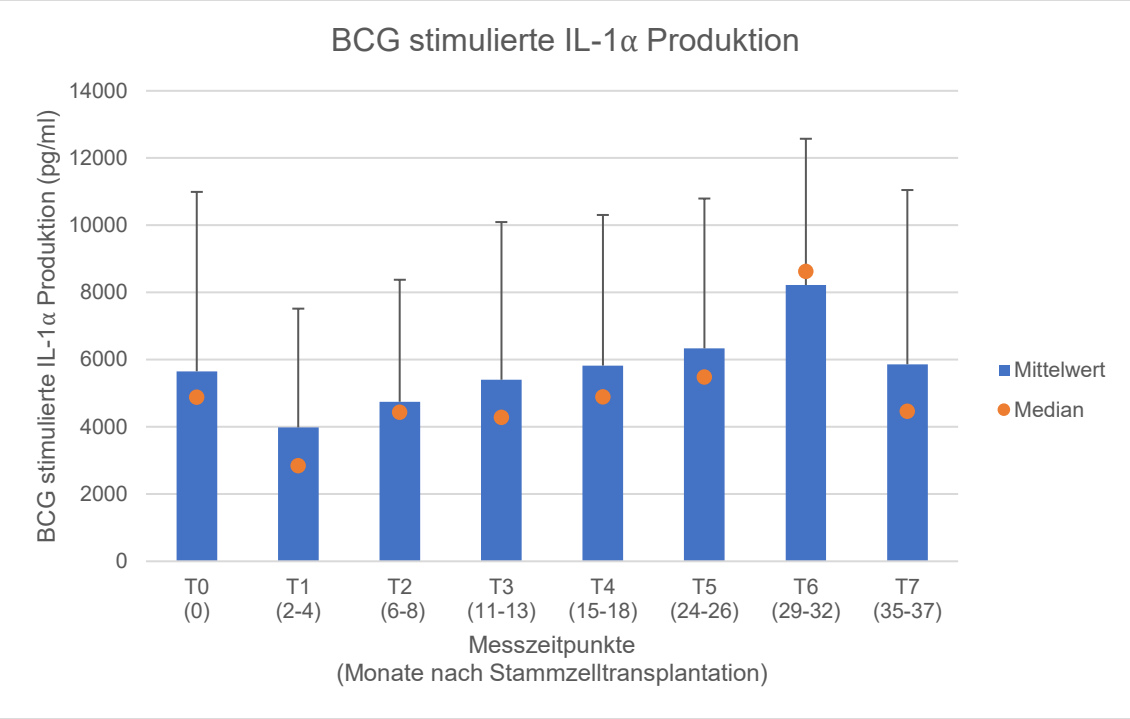

Abbildung 27: Bacillus Calmette-Guérin (BCG) stimulierte IL-1α Produktion je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

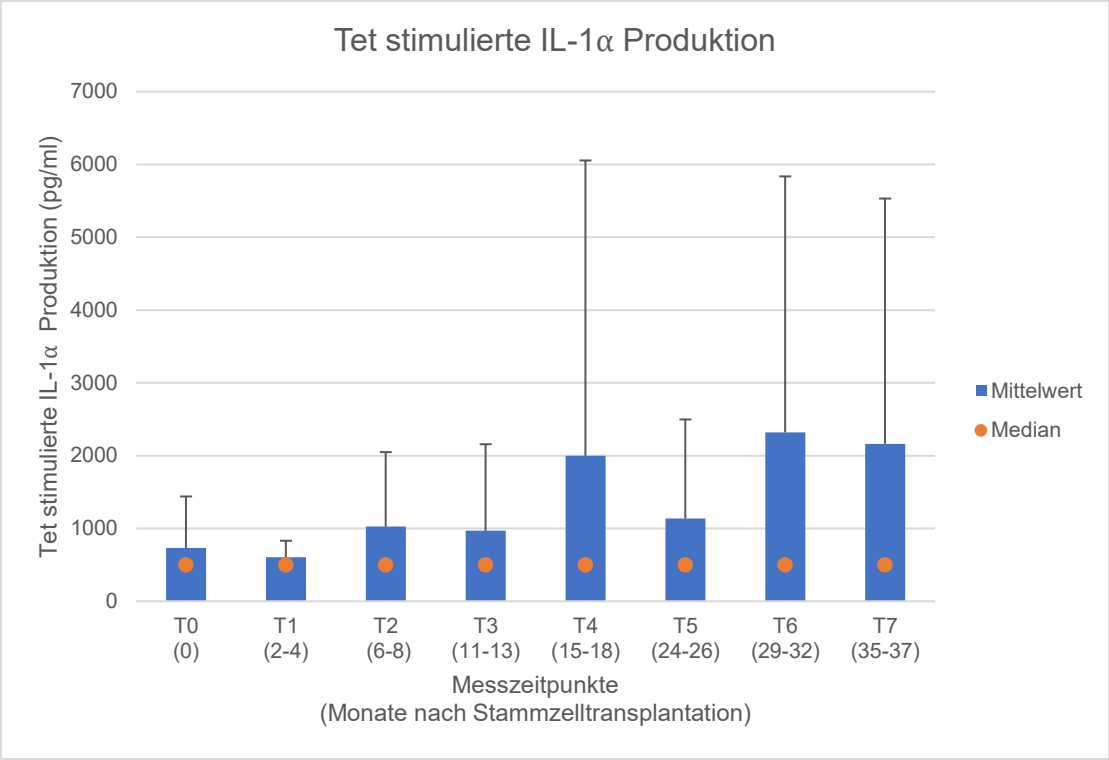

Abbildung 28: Tetanol (Tet) stimulierte IL-1α Produktion je Messzeitpunkt (T).
Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

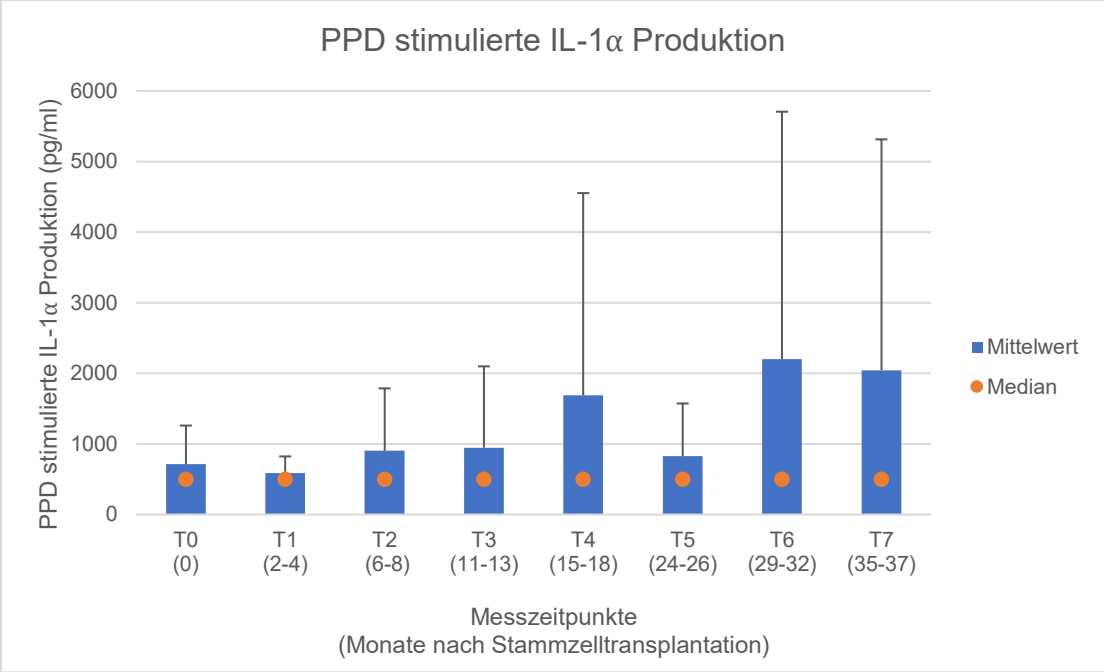

Abbildung 29: purified proteine derivative (PPD) stimulierte IL-1α Produktion je Messzeitpunkt (T).
Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

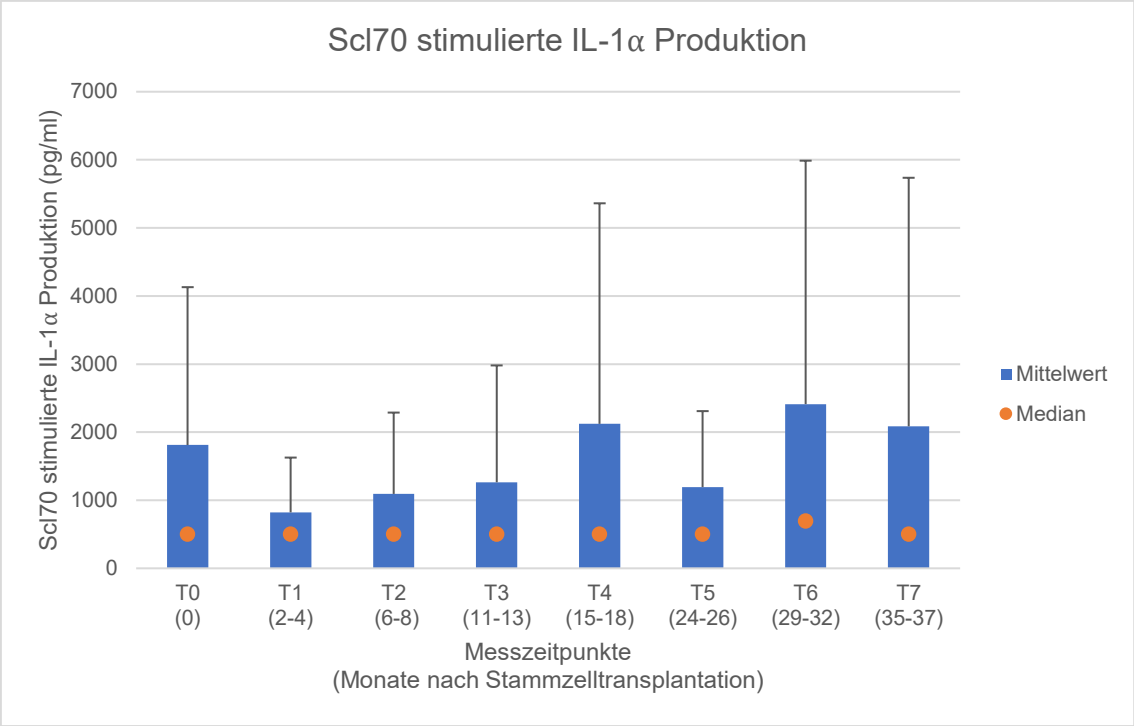

Abbildung 30: Topoisomerase I (Scl70) stimulierte IL-1α Produktion je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

IL-6 wies ebenso keine signifikanten Veränderungen (BCG: *p*=. 398; Tet: *p*= .647; PPD: *p*= .947; Scl70: *p*= .987) auf (siehe *Abbildungen 31* bis *34*)

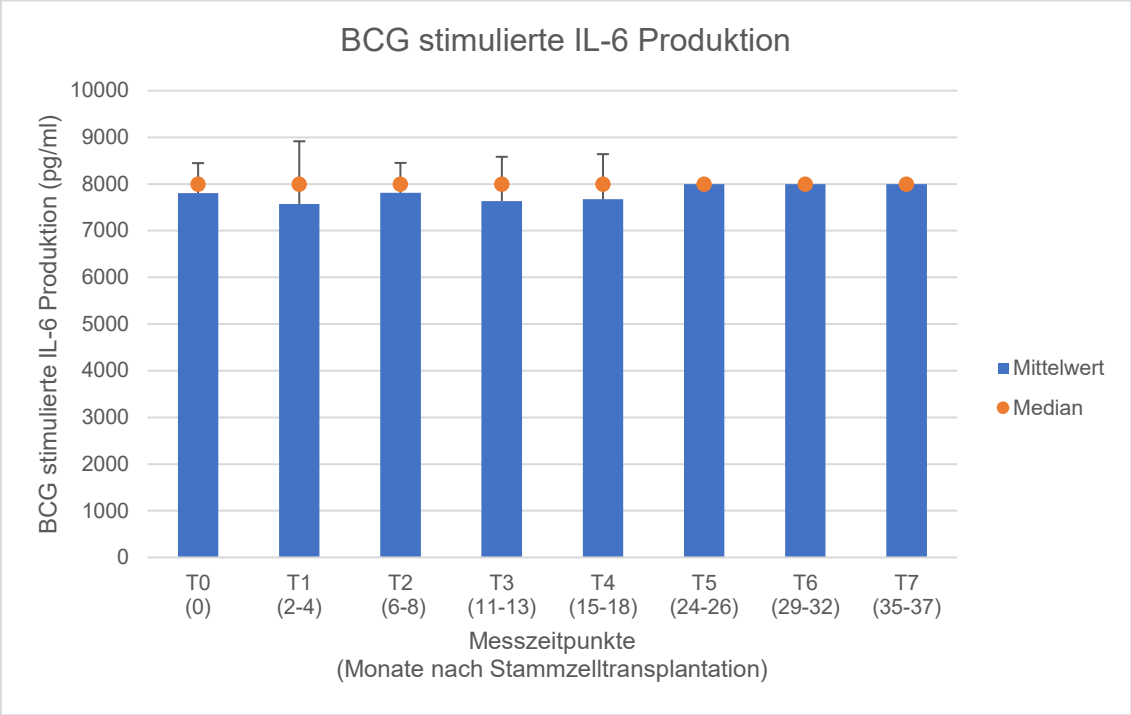

Abbildung 31: Bacillus Calmette-Guérin (BCG) stimulierte IL-6 Produktion je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

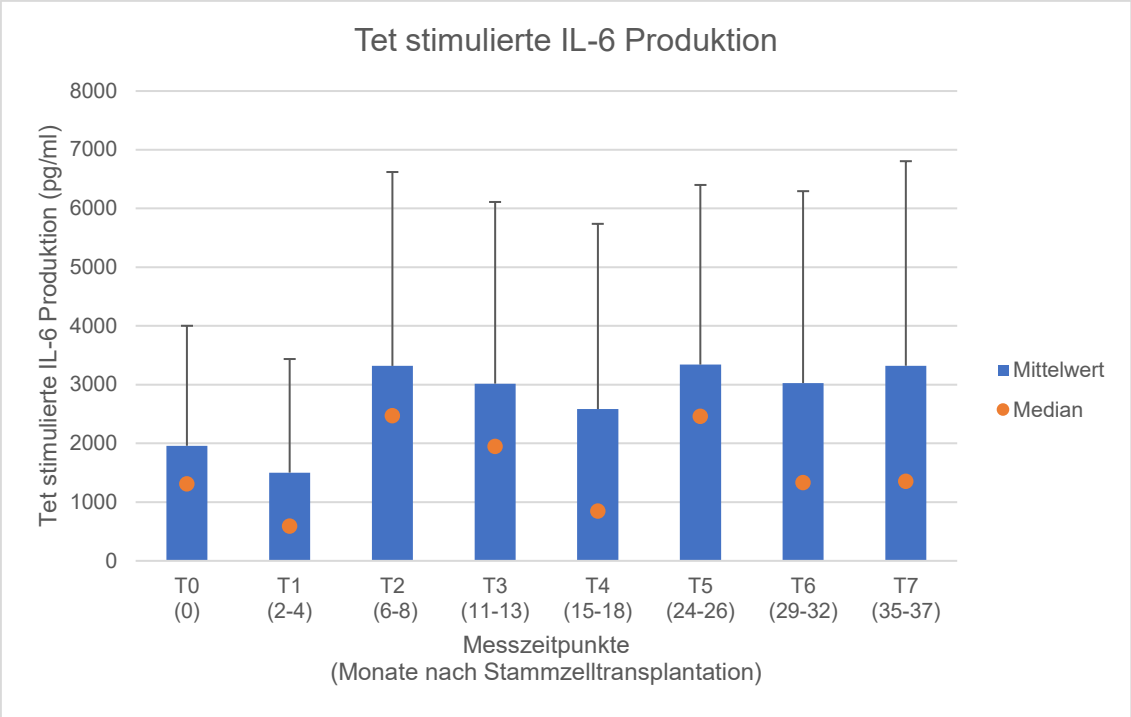

Abbildung 32: Tetanol (Tet) stimulierte IL-6 Produktion je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

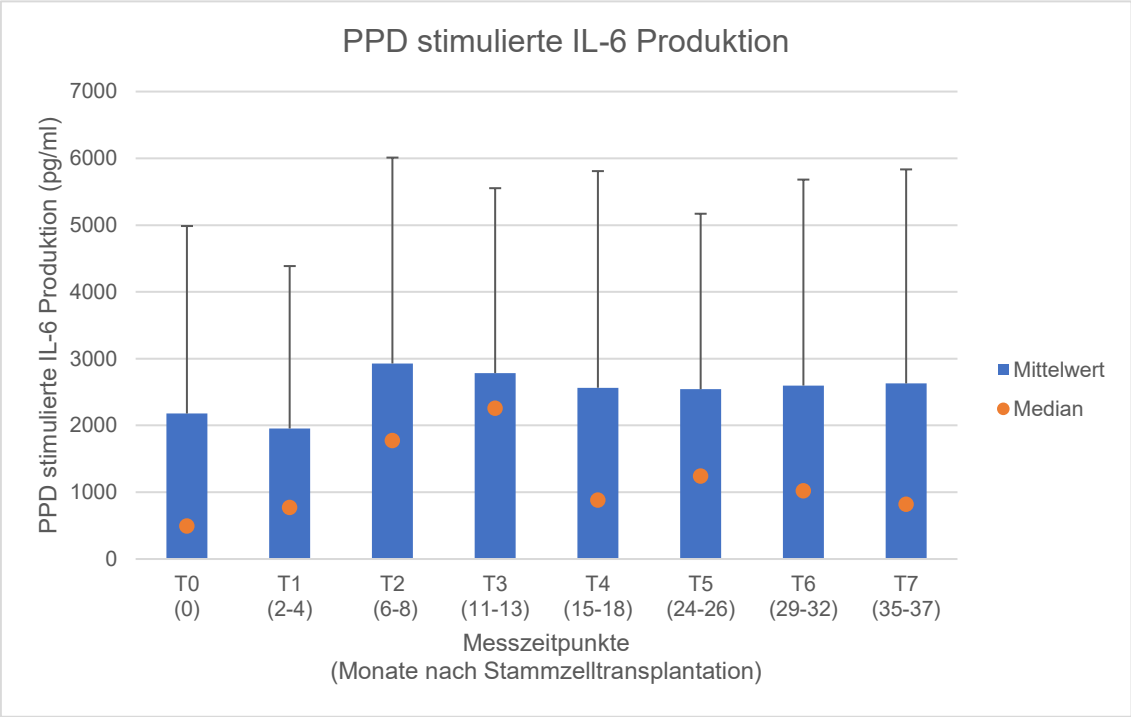

Abbildung 33: purified proteine derivative (PPD) stimulierte IL-6 Produktion je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

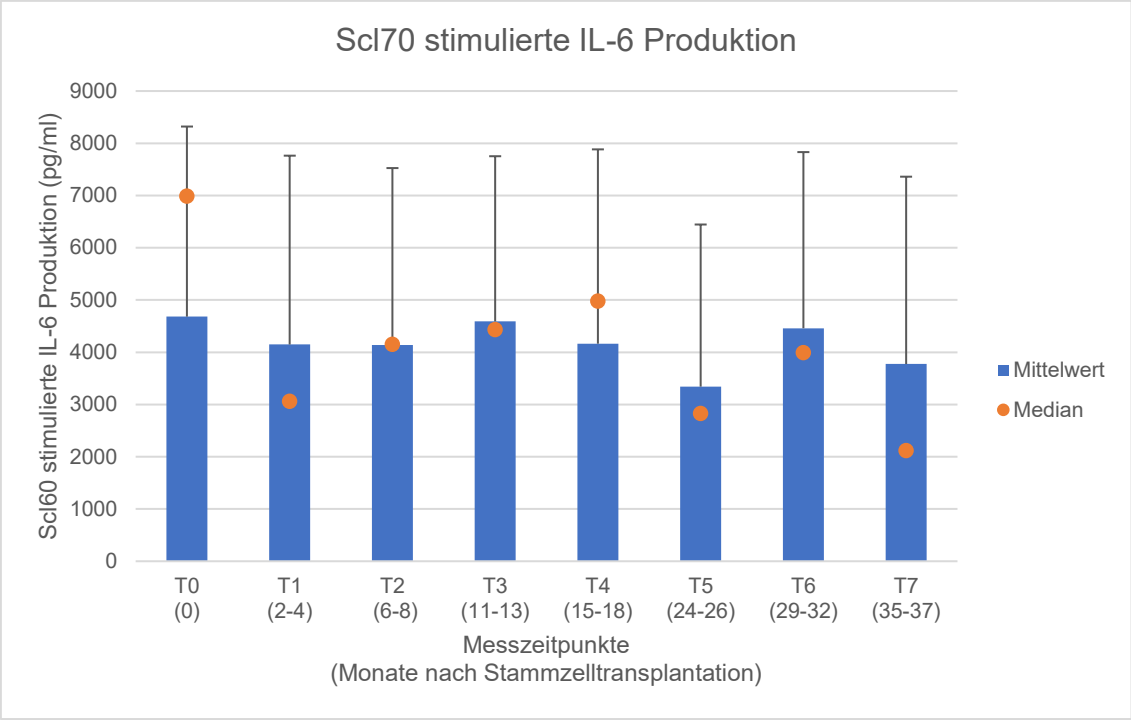

Abbildung 34: Topoisomerase I (Scl70) stimulierte IL-6 Produktion je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

Auch das dritte proinflammatorische Zytokin in Form von IL-17 zeigte unter der genannten Antigen Stimulation (BCG: *p*= .454; Tet: *p*= .294; PPD: *p*= .801; Scl70: *p*= .406) keine signifikanten Veränderungen. Die *Abbildungen 35* bis *38* zeigen die deskriptiven Werten zu den Zytokinausschüttungen unter Antigen Stimulation.

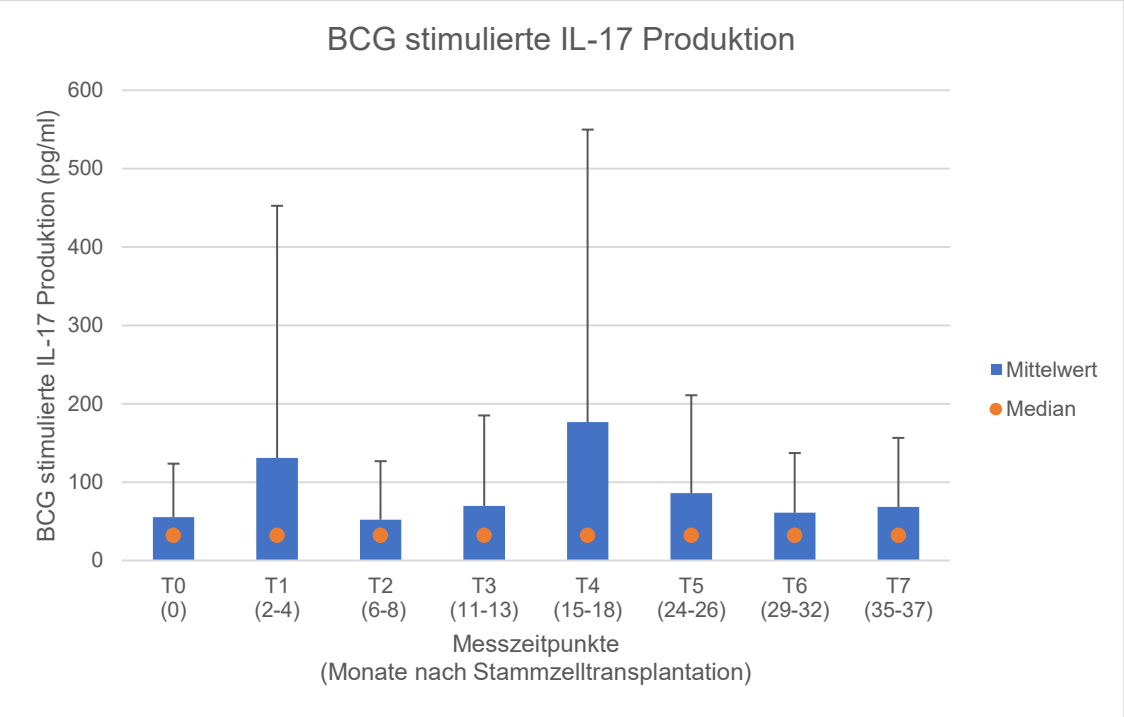

Abbildung 35: Bacillus Calmette-Guérin (BCG) stimulierte IL-17 Produktion je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

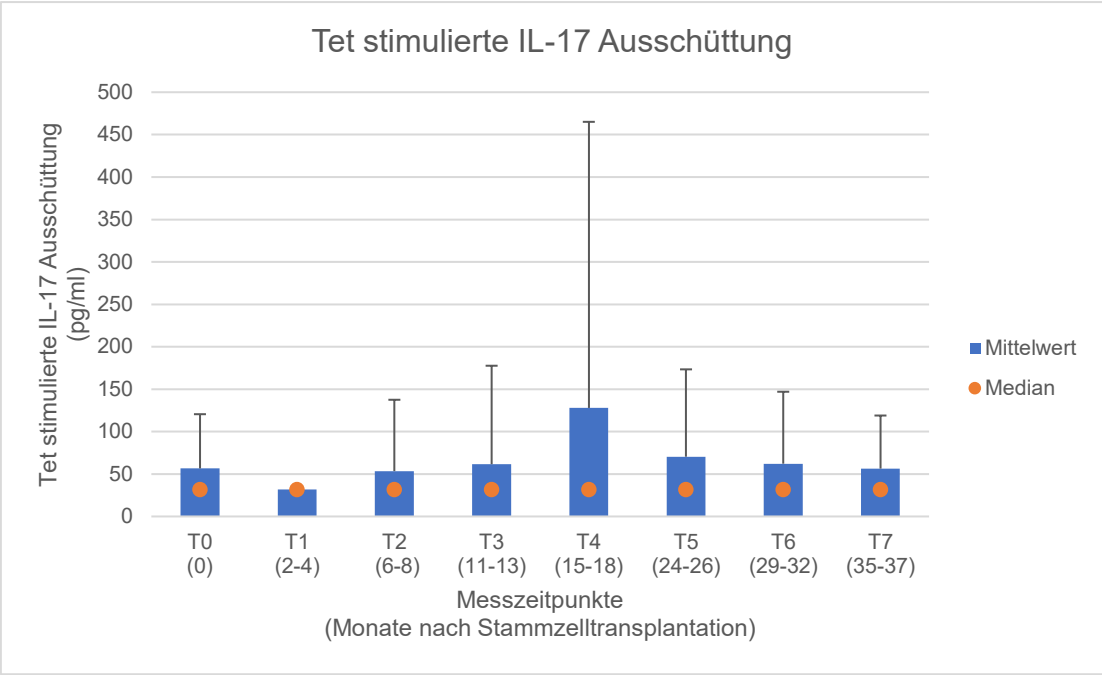

Abbildung 36: Tetanol (Tet) stimulierte IL-17 Produktion je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

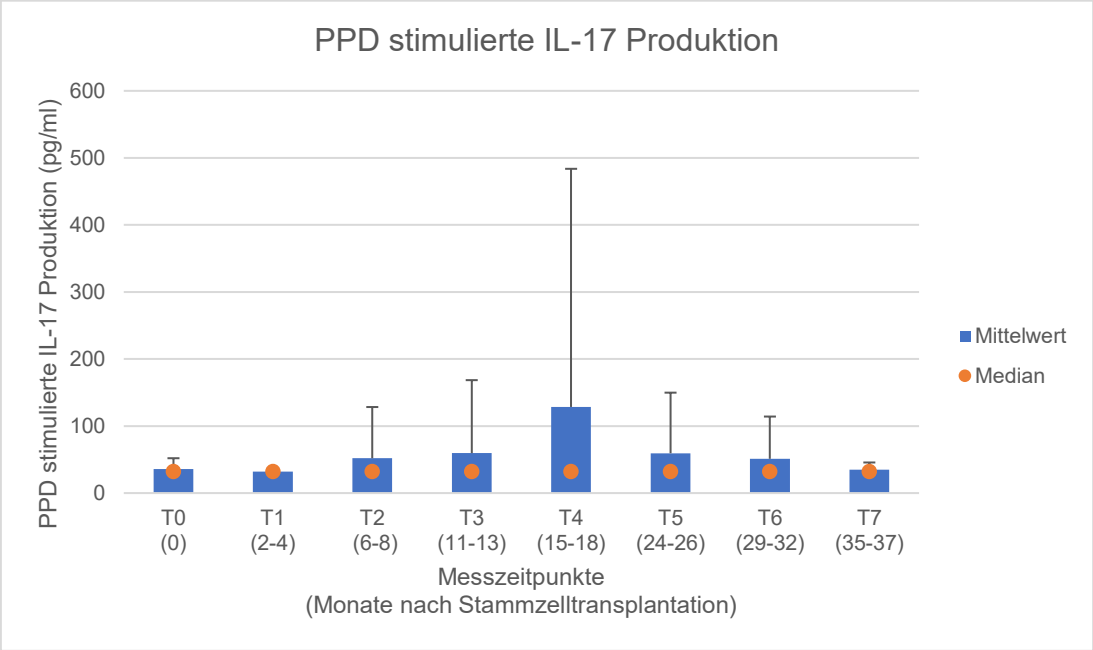

Abbildung 37: purified proteine derivative (PPD) stimulierte IL-17 Produktion je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

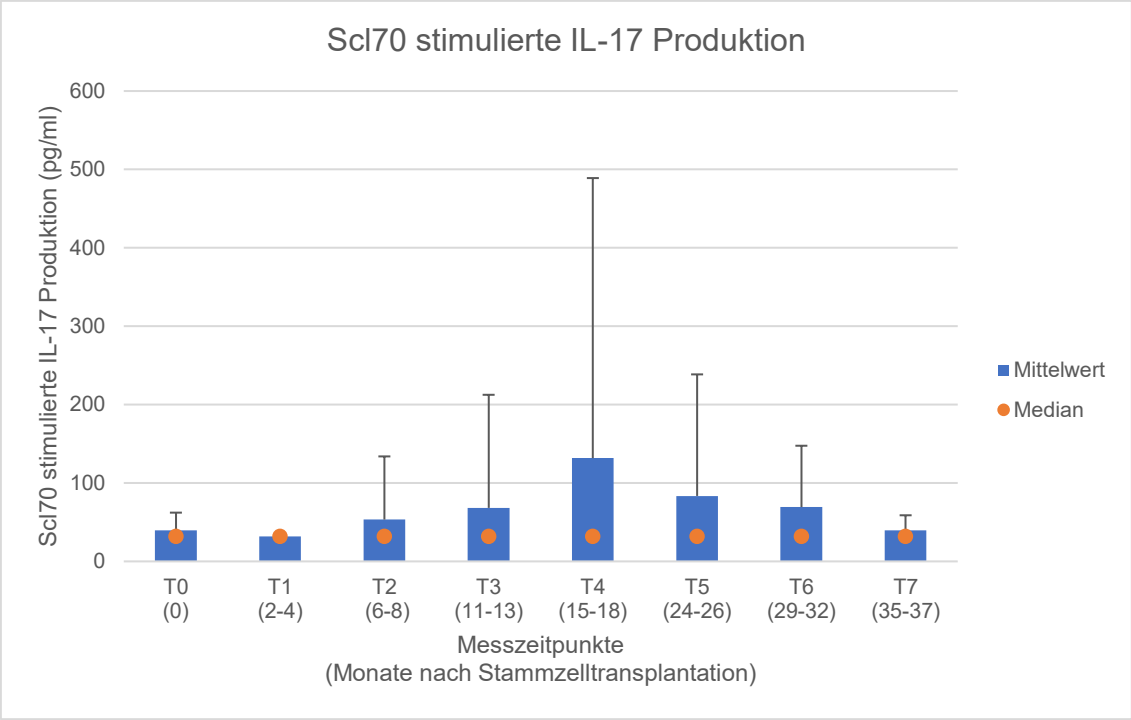

Abbildung 38: Topoisomerase I (Scl70) stimulierte IL-17 Produktion je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

Auch TNF-α, welches ebenfalls eine Proinflammation begünstigen kann, wies keine signifikanten Veränderungen (BCG: *p*= .184; Tet: *p*= 1.0; PPD: *p*= .406; Scl70: *p*= .219) auf (*Abbildungen 39* bis *42*).

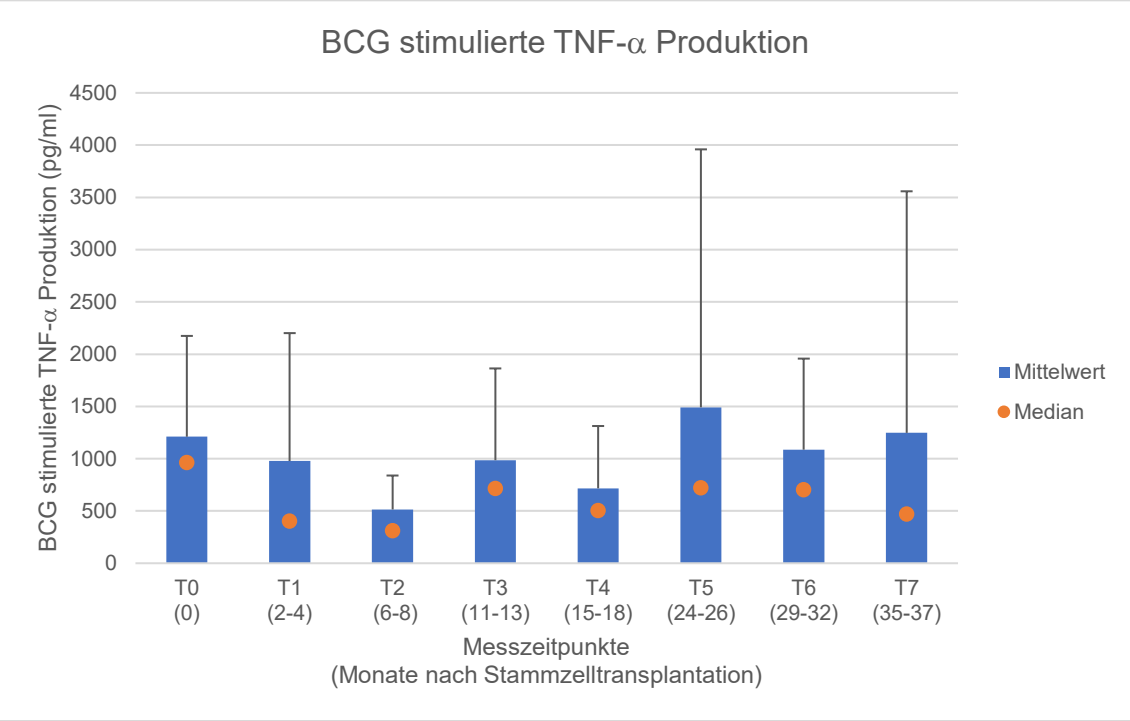

Abbildung 39: Bacillus Calmette-Guérin (BCG) stimulierte TNF-α Produktion je Messzeitpunkt (T).
Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

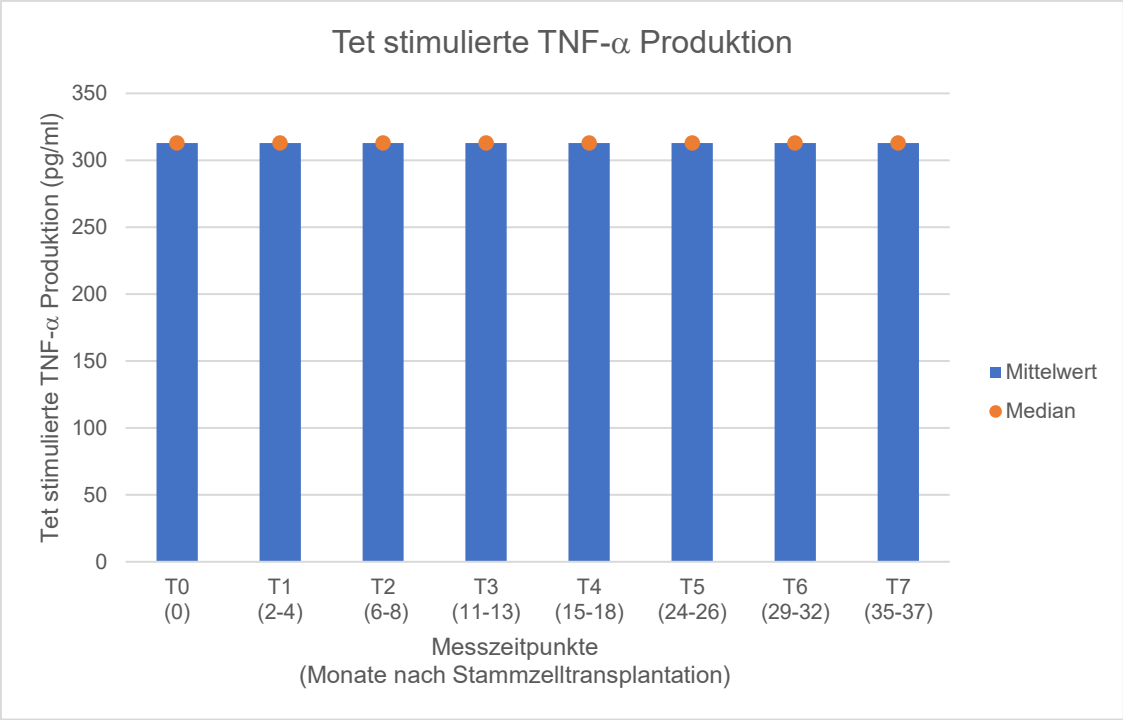

Abbildung 40: Tetanol (Tet) stimulierte TNF-α Produktion je Messzeitpunkt (T).
Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

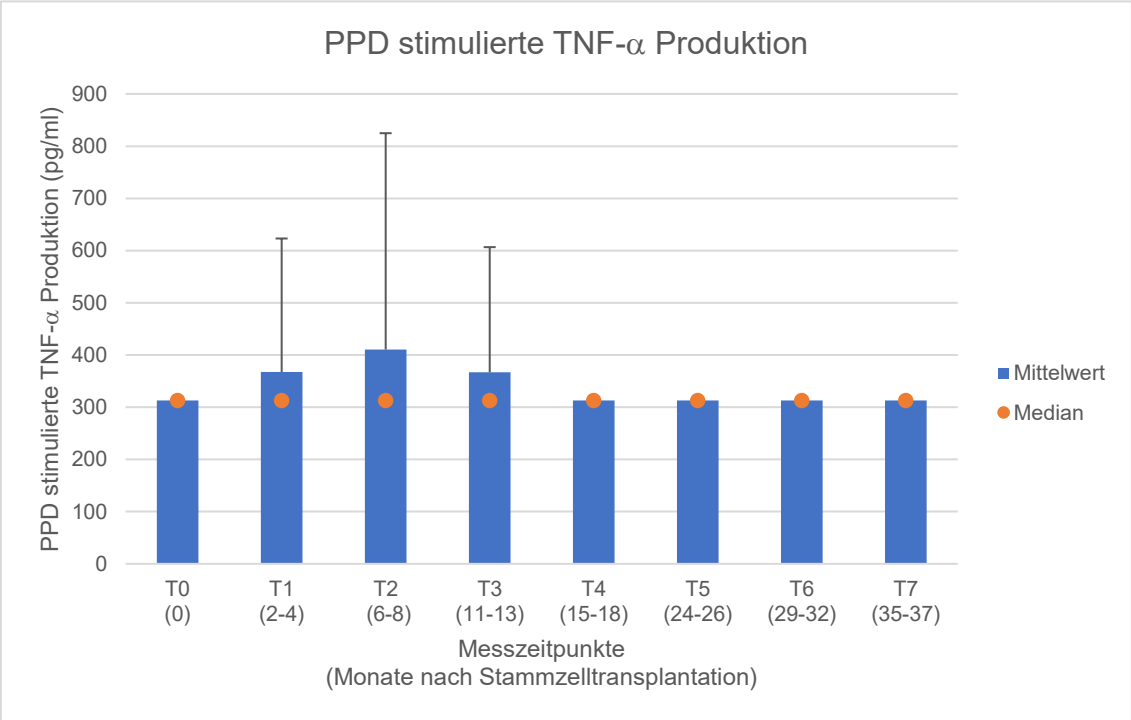

Abbildung 41: purified proteine derivative (PPD) stimulierte TNF-α Produktion je Messzeitpunkt (T).
Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

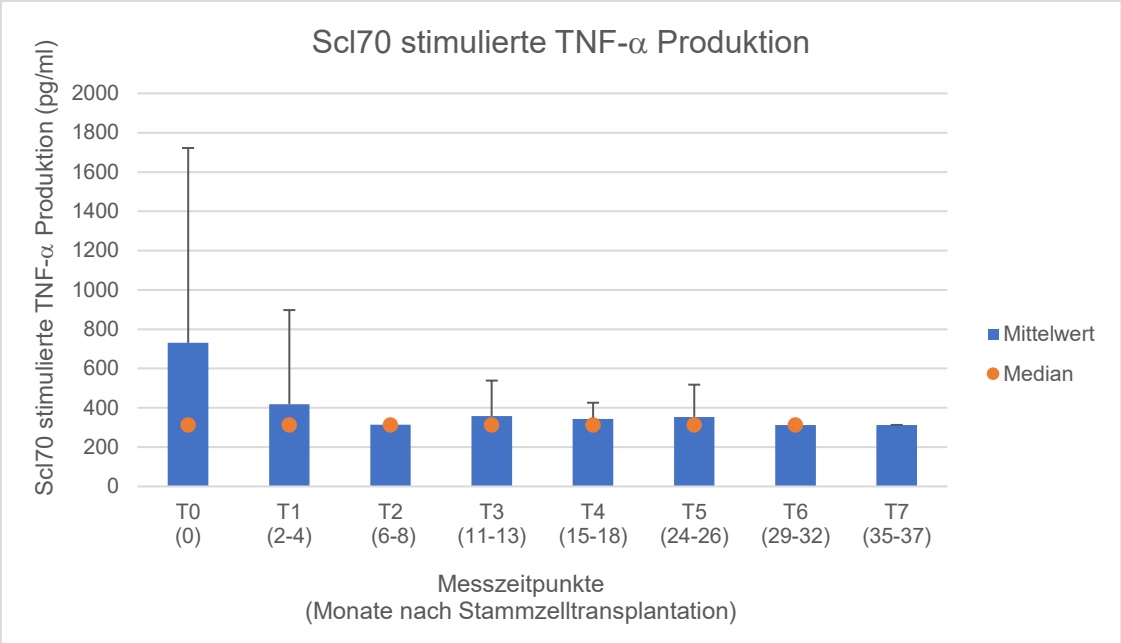

Abbildung 42: Topoisomerase I (Scl70) stimulierte TNF-α Produktion je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

3.3.1.4 Anti-inflammatorische Zytokine (IL-10)

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen proinflammatorischen Zytokinen wies die antiinflammatorische IL-10 Produktion unter Tet Stimulation eine signifikante Veränderung (*p*= .035) auf (siehe *Abbildung 44)*. BCG (*p*= .281), PPD (*p*= .393) und Scl70 (*p*= .208) Stimulation zeigten hingegen keine signifikanten Veränderungen (*Abbildungen 43, 45 - 46*).

Es ist eine Zunahme der Tet stimulierten IL-10 Produktion nach HSCT zu erkennen. Im eingangs beschriebenen paarweisen Vergleich mit T0 haben sich allerdings keine signifikanten Veränderungen der Messzeitpunkte T1 und Folgende ergeben.

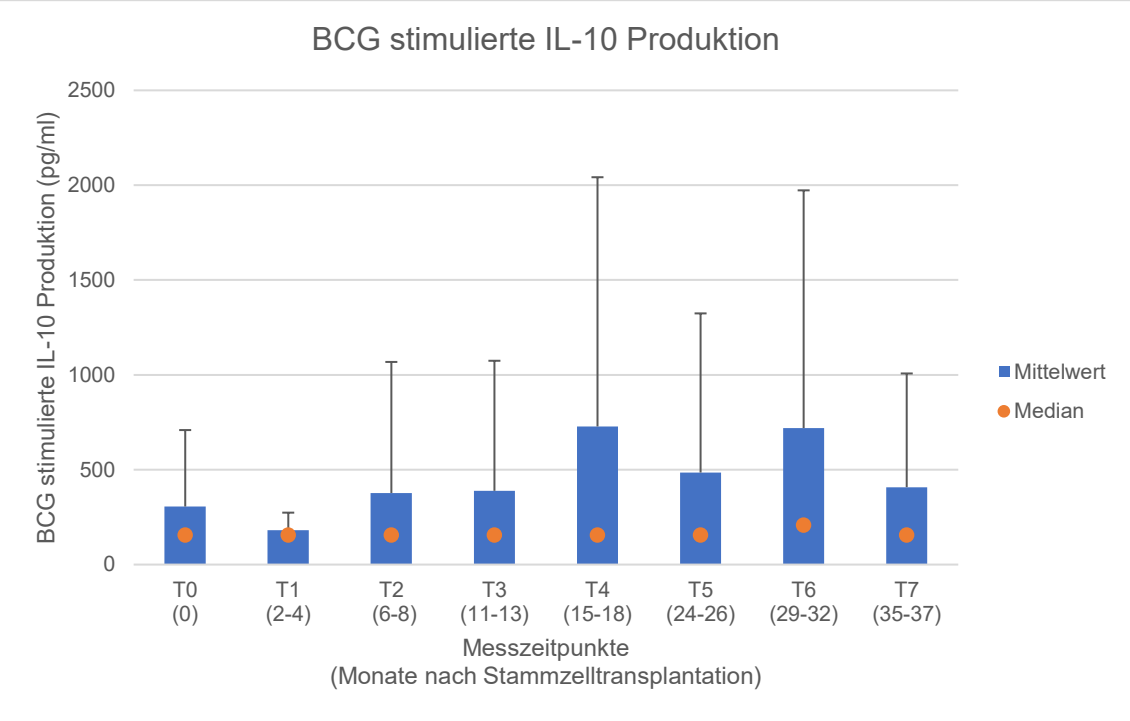

Abbildung 43: Bacillus Calmette-Guérin (BCG) stimulierte IL-10 Produktion je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

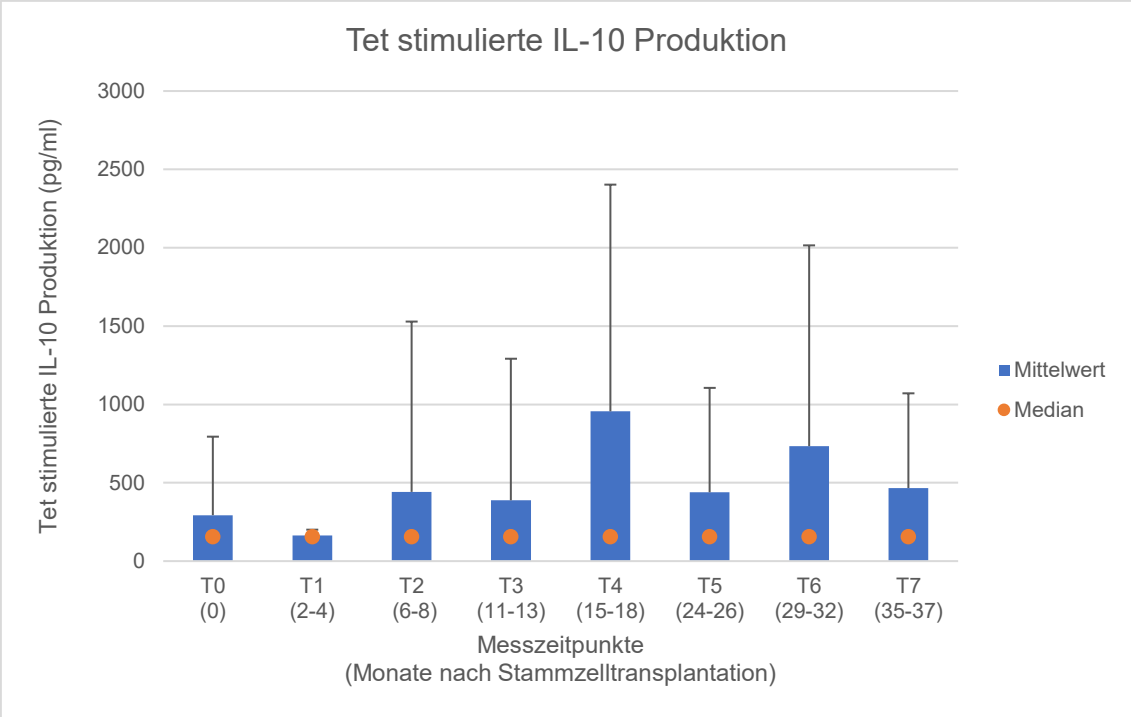

Abbildung 44: Tetanol (Tet) stimulierte IL-10 Produktion je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

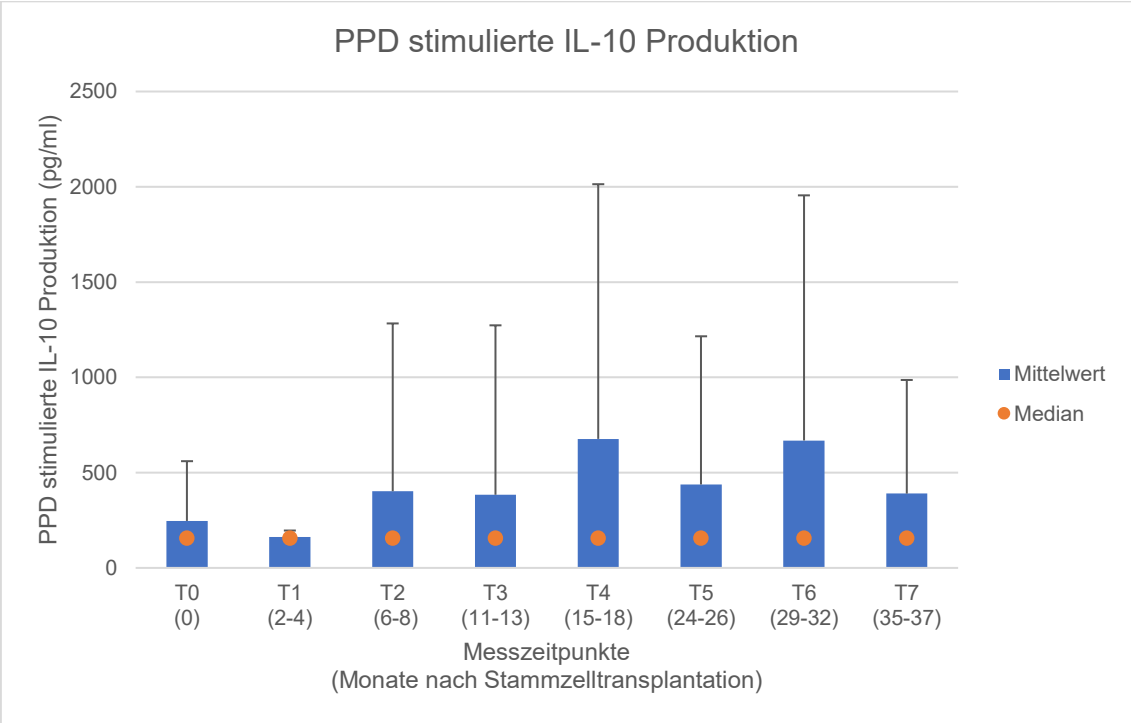

Abbildung 45: purified proteine derivative (PPD) stimulierte IL-10 Produktion je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

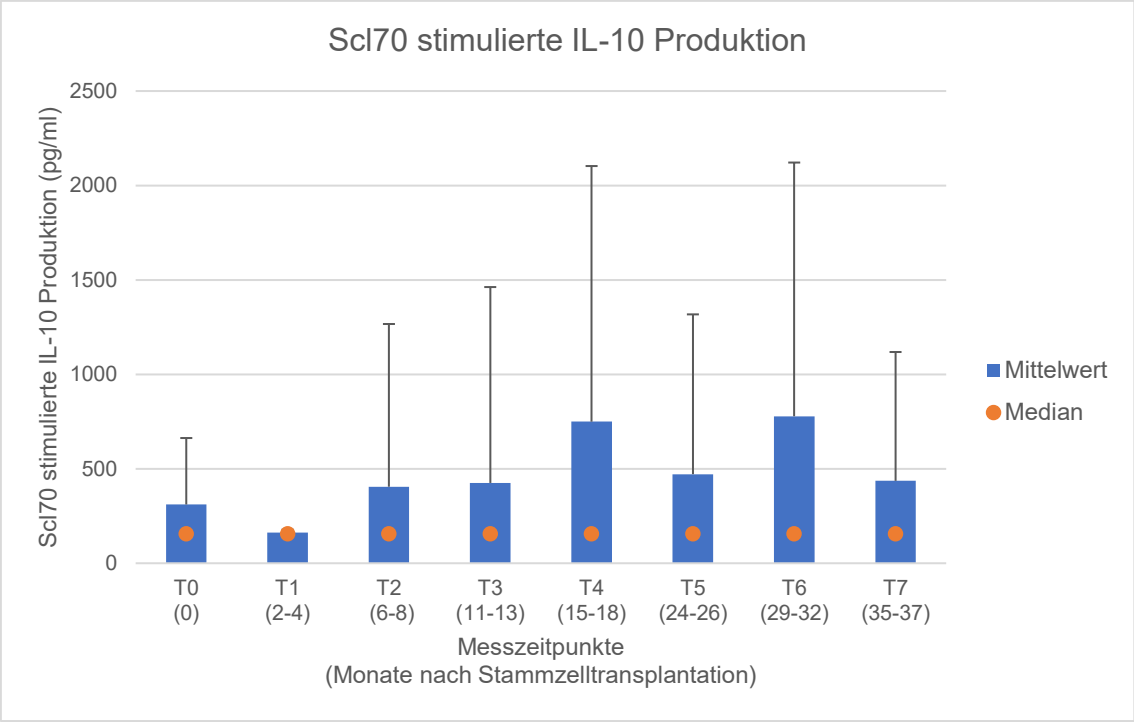

Abbildung 46: Topoisomerase I (Scl70) stimulierte IL-10 Produktion je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

3.3.1.5 GM-CSF

Ferner wurde die GM-CSF Produktion gemessen, welche eine Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zu Makrophagen und Granulozyten bewirkt. Die Scl70 stimulierte GM-CSF Produktion (siehe *Abbildung 50*) zeigte eine statistisch signifikante Änderung (p= .039). Alle anderen Antigene (BCG: p= .066; Tet: p= .263; PPD p= .845) wiesen keine signifikante Veränderung auf (siehe *Abbildungen 47-49*).

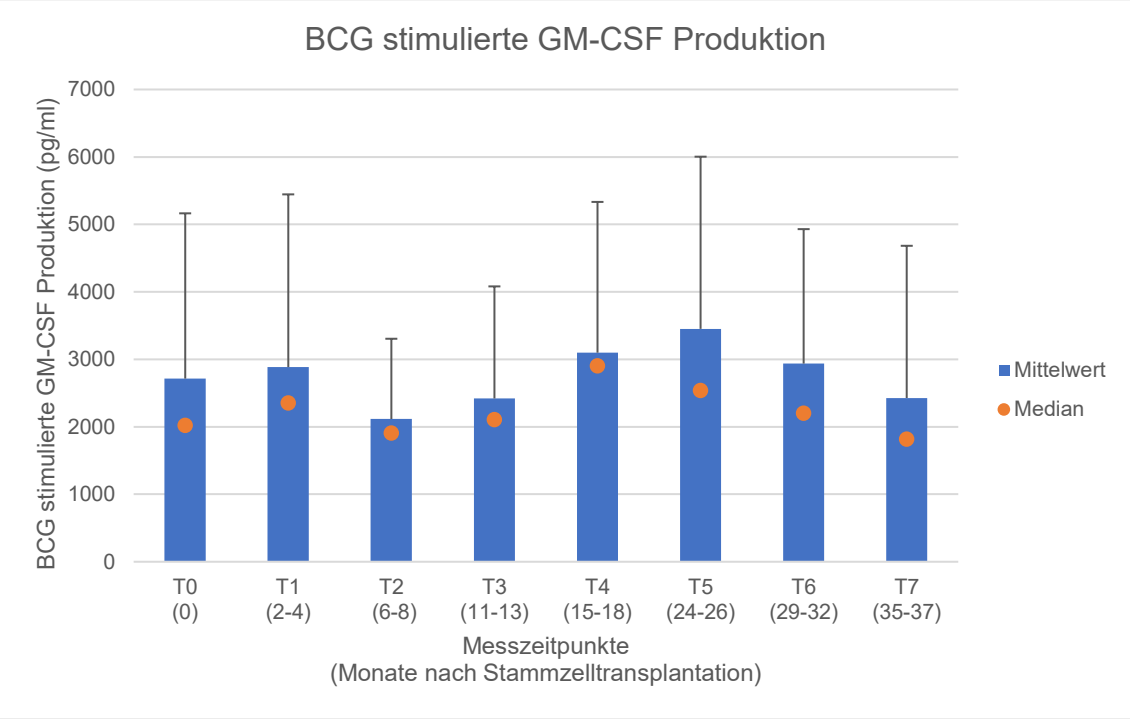

Abbildung 47: Bacillus Calmette-Guérin (BCG) stimulierte GM-CSF Produktion je Messzeitpunkt (T).
Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

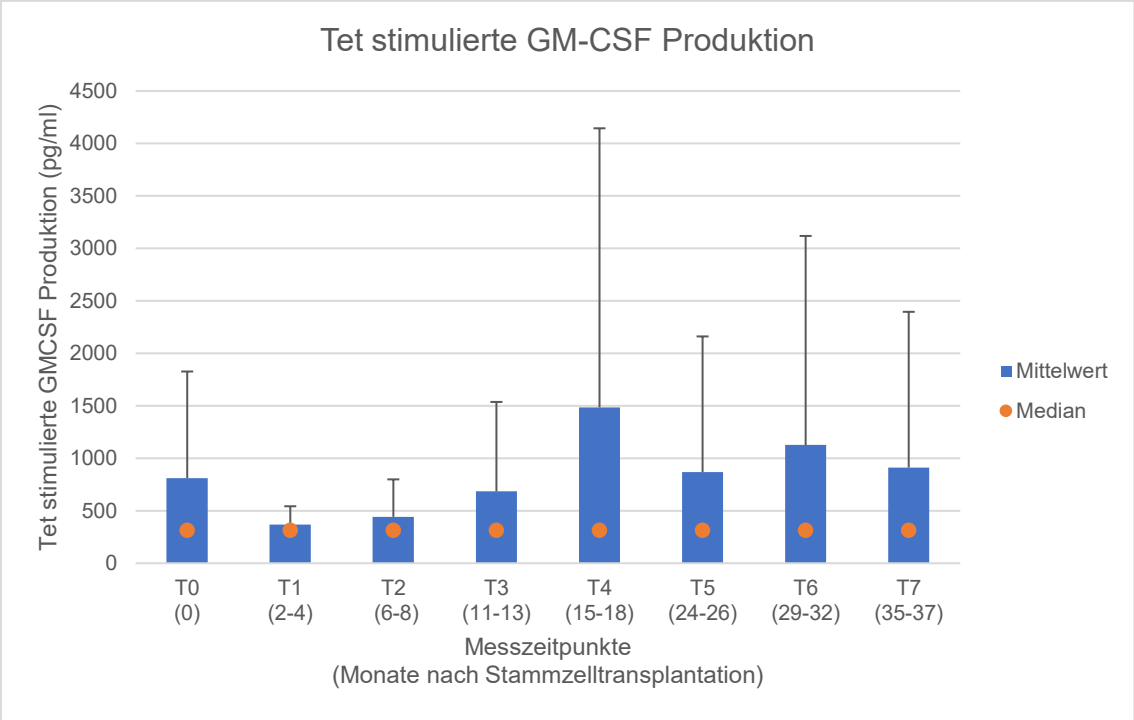

Abbildung 48: Tetanol (Tet) stimulierte GM-CSF Produktion je Messzeitpunkt (T).
Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

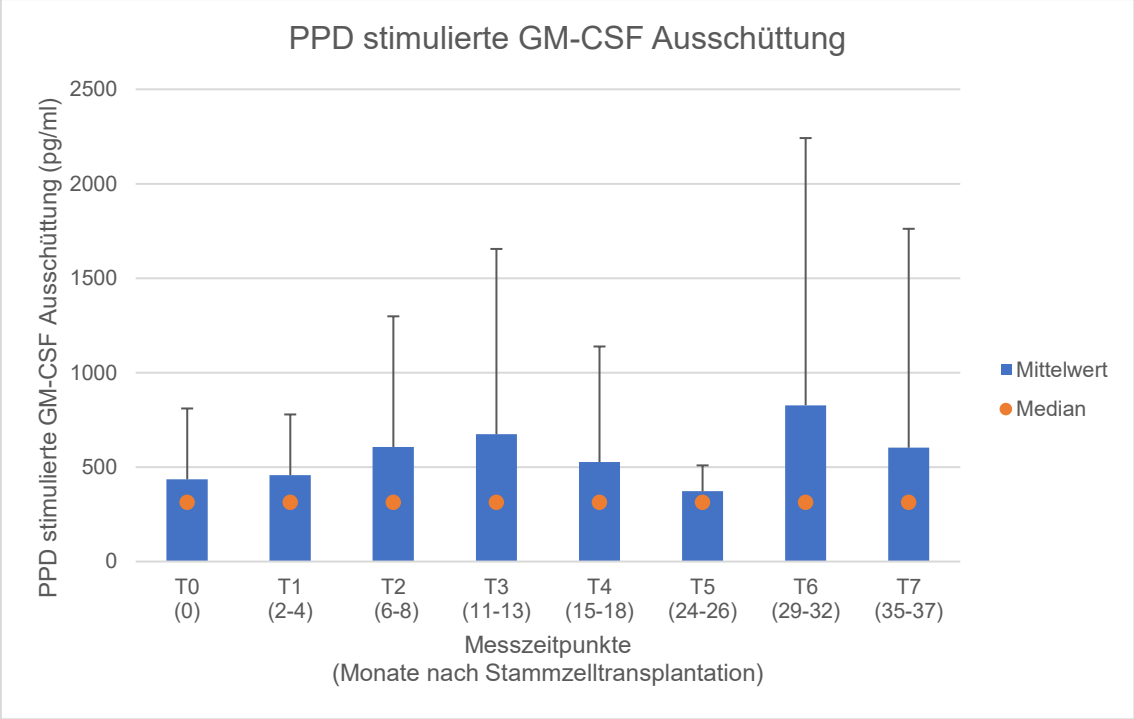

Abbildung 49: purified proteine derivative (PPD) stimulierte GM-CSF Produktion je Messzeitpunkt (T).
Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

Führt man auch hier den paarweisen Vergleich der Messzeitpunkte nach HSCT mit T0 durch, zeigt sich eine um Bonferroni korrigierte, signifikante Abnahme der Scl70 stimulierten GM-CSF Produktion zu den Messzeitpunkten T1 (p= .035), T2 (p= .021), T3 (p= .042), d.h. das erste Jahr nach HSCT betreffend und zum Messzeitpunkt T7 (p= .021).

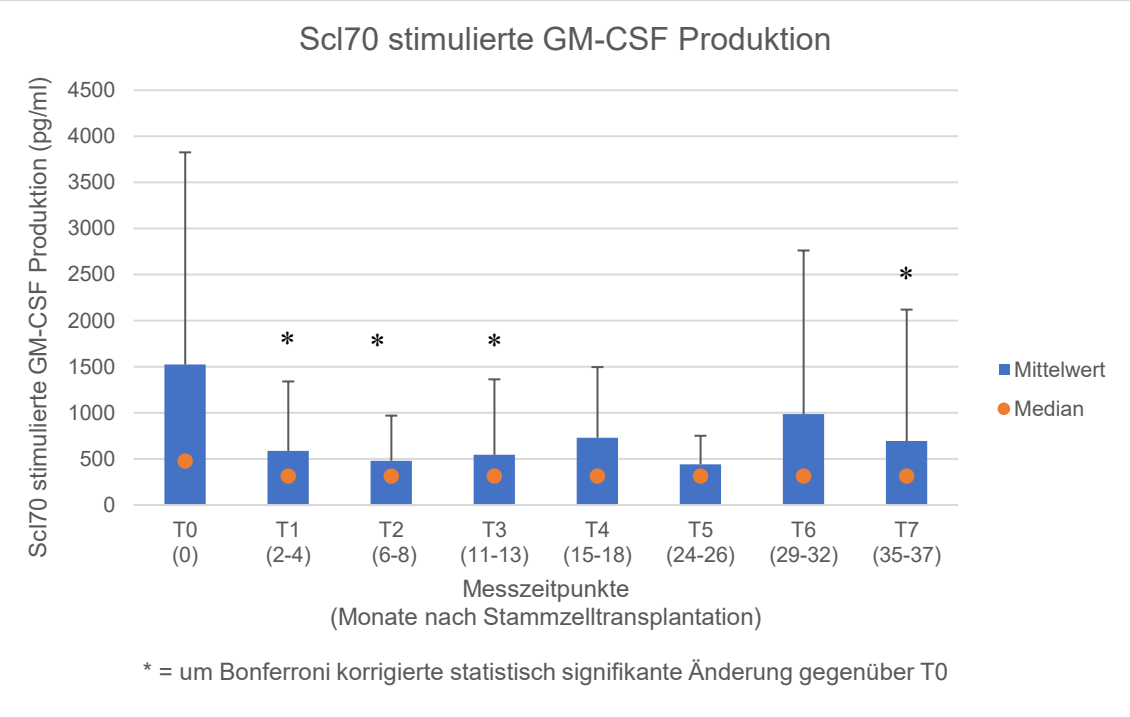

*Abbildung 50: Topoisomerase I (Scl70) stimulierte GM-CSF Produktion je Messzeitpunkt (T). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar. Um Bonferroni korrigierte, statistisch signifikante Unterschiede (p< 0.05 / 7) im Messzeitpunktvergleich mit T0 sind mit * markiert.*

3.3.2 T_H1 und T_H2-Typisierung anhand des Zytokinmuster

Insgesamt wurden 150 Typisierungen nach in *Kapitel 2.3.7* aufgeführter Definition durchgeführt. Dabei lagen Daten von mindestens 15 Probanden je Messzeitpunkt vor. Zu beachten gilt auch hier wieder, dass nicht von allen Probanden zu jedem Messzeitpunkt ein Zytokinmuster ausgewertet werden konnte. Die folgende *Abbildung 51* bildet die Ergebnisse ab.

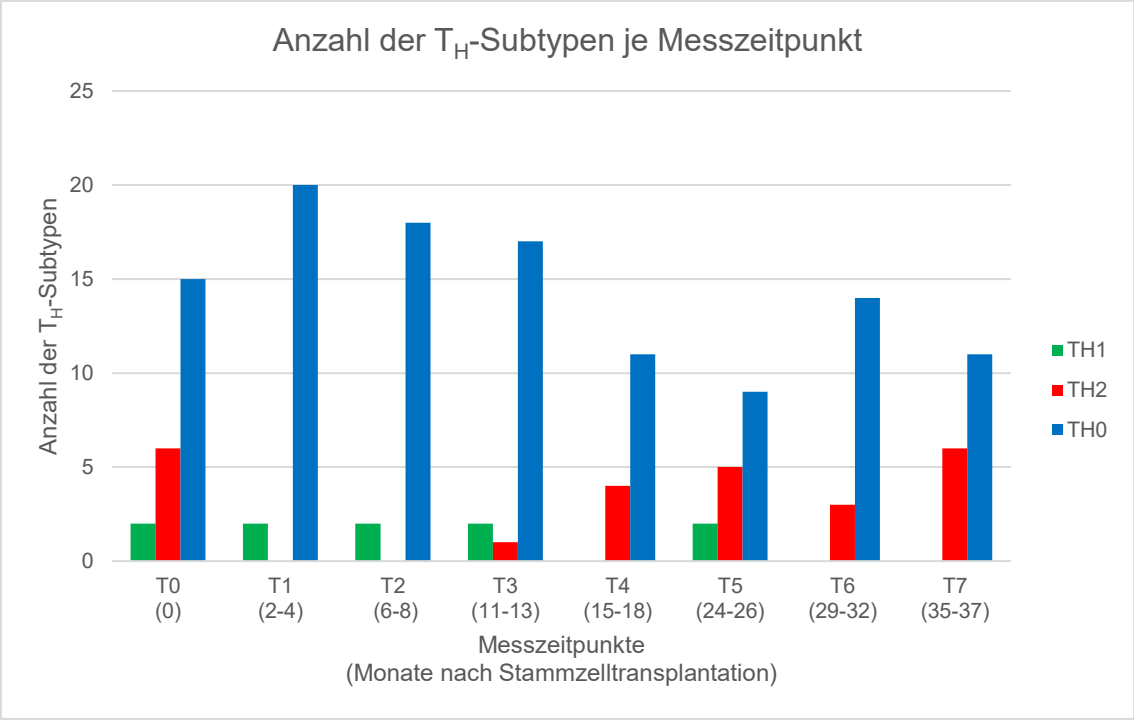

Abbildung 51: Anzahl der T_H-Typen je Messzeitpunkt (T).

Zu allen 8 Messzeitpunkten überwog der T_H0-Typ. So zeigten vor Transplantation 15 Probanden einen T_H0-Typ, 6 Probanden einen T_H2-Typ und nur 2 Probanden ein T_H1-Zytokinmuster. Eine vermehrte Aktivierung des T_H2-Typs, wie in der Literatur bei SSc Patienten teilweise beschrieben (Kuzumi et al., 2021, Paleja et al., 2020), zeigte sich in unserer Stichprobe allenfalls im direkten Vergleich zwischen T_H1 und T_H2 unter Ausschluss des T_H0-Typs. Auffällig war jedoch ein Verschwinden des T_H2-Typs unmittelbar nach HSCT, genauer zu Messzeitpunkt T1 und T2, die das erste Halbjahr nach HSCT umfassen. Auch zum Messzeitpunkt T3 zeigte sich nur bei einem Probanden ein T_H2-Typ, verglichen mit 6 Probanden vor HSCT. Ab dem Messzeitpunkt T4, d.h. ca. 1,5 Jahre nach HSCT war deskriptiv wieder ein Anstieg der T_H2-Fälle zu verzeichnen. Im Folgenden sind die 6 vor HSCT T_H2-polarisierten Probanden in ihrer T_H-Typisierung im Verlauf nach HSCT näher dargestellt.

Tabelle 13: T_H-Typisierung, der vor HSCT T_H2-polarisierten Probanden

Proband	Zeitpunkt (Monate nach HSCT)	T_H-Typ
14	0 (0)	**2**
16	0 (0)	**2**
16	1 (2-4)	**0**
16	2 (6-8)	**0**
16	3 (11-13)	**0**
16	4 (15-18)	**2**
16	5 (24-26)	**2**
16	6 (29-32)	**2**
16	7 (35-37)	**2**
26	0 (0)	**2**
26	2 (6-8)	**0**
26	3 (11-13)	**0**
26	6 (29-32)	**0**
28	0 (0)	**2**
28	1 (2-4)	**0**
28	2 (6-8)	**0**
28	3 (11-13)	**2**
28	7 (35-37)	**0**
33	0 (0)	**2**
33	2 (6-8)	**0**
33	3 (11-13)	**0**
33	5 (24-26)	**2**
33	6 (29-32)	**0**
33	7 (35-37)	**0**
30	0 (0)	**2**
30	3 (11-13)	**0**
30	4 (15-18)	**0**
30	6 (29-32)	**0**

Von Proband 14 liegen keine Daten nach HSCT vor. Bei allen anderen Patienten wird der zuvor beschriebene T_H-Wechsel von T_H2 zu T_H 0, welcher bis zum 12. Monat nach HSCT anhält, deutlich. Keiner der o.g. Probanden zeigt im Verlauf einen Wechsel zu T_H1.

3.4 Klinische Daten (modifizierter Rodnan Skin Score)

Neben den bereits beschriebenen immunologischen Daten wurden auch klinische Parameter ermittelt. So wurde zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten vor und bis zu 3 Jahre nach HSCT der mRSS erhoben. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt. Neben dem Mittelwert sind der Median und die Standardabweichung des mRSS je Untersuchungszeitpunkt angegeben. Zudem wurden die Untersuchungszeitpunkte U(3) und Folgende mittels gepaartem t-Test auf statistisch signifikante Veränderungen gegenüber U(0) getestet. Ein Signifikanzniveau von $p < 0.05$ wurde erneut entsprechend der Anzahl der durchgeführten Tests um Bonferroni korrigiert. Diese sind in der folgenden Grafik mit * markiert. Auf der x-Achse ist der Untersuchungszeitpunkt sowie darunter die Probandenzahl je Untersuchungszeitpunkt angegeben. Die y-Achse bildet die Höhe des mRSS ab.

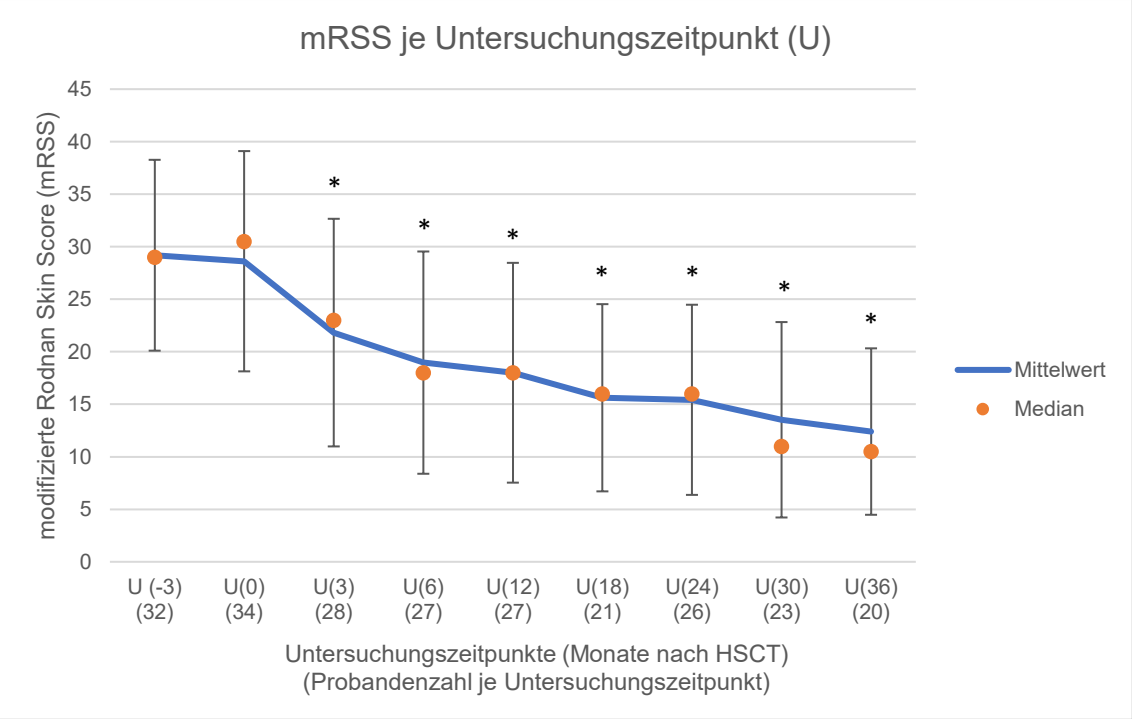

Abbildung 52: mRSS je Untersuchungszeitpunkt (U).
*Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwert dar. Um Bonferroni korrigierte, statistisch signifikante Unterschiede (p< 0.05 / 7) im Messzeitpunktvergleich mit U(0) sind mit * markiert.*

Der mRSS nimmt kontinuierlich und statistisch signifikant ab dem ersten Messzeitpunkt U(3), d.h. 3 Monate nach HSCT, gegenüber dem Vortransplantationszeitraum U(0) ab. Die statistisch signifikante Abnahme hält im Messzeitpunktvergleich der nachfolgenden Untersuchungszeitpunkte mit U(0) an.

Probanden, die kein 25% Absinken des mRSS gegenüber U(0) an 3 aufeinander folgenden Untersuchungen zeigten, wurden als Non-Responder klassifiziert. Dies traf auf 3 von 27 Probanden zu. Probanden, die ein 25% Absinken des mRSS gegenüber U(0) an 3 aufeinander folgenden Untersuchungen, aber hiernach wieder einen Anstieg des mRSS auf weniger als 25% des Ausgangswertes aufwiesen, wurden als Patienten mit Relapse klassifiziert. Dies traf auf 2 Probanden zu.

3.5 Gegenüberstellung klinischer und immunologischer Daten

Wir haben ferner versucht die in 3.3.2 und 3.4 erhobenen immunologischen Daten in Form der T_H-Typisierung, den klinischen Daten in Form des mRSS gegenüberzustellen, um potenzielle Muster oder Gemeinsamkeiten zu erkennen. Dabei haben uns 3 Probandengruppen besonders interessiert. Zum einen die zuvor beschriebenen klinischen Non-Responder und Patienten mit Relapse, sowie die Patienten, die vor HSCT T_H2 polarisiert waren.

3.5.1 T_H-Typisierung und mRSS der klinischen Non-Responder

In der folgenden Tabelle sind die T_H-Typisierung und der mRSS der Non-Responder gegenübergestellt. In der letzten Spalte sind die mRSS-Ausgangswerte blau markiert. Rot symbolisiert kein klinisches Ansprechen in Bezug auf den mRSS nach o.g. Definition. Aufgrund der geringen Anzahl an Non-Respondern sind keine Muster oder Gemeinsamkeiten erkennbar.

Tabelle 14: T_H-Typisierung und mRSS der klinischen Non-Responder

Proband	Zeitpunkt (Monate nach Stammzelltransplantation)	T_H-Typ	mRSS
9	0 (0)	**0**	30
9	1 (2-4)	**0**	29
9	2 (6-8)	**0**	27
9	3 (11-13)	**1**	26
9	5 (24-26)	**0**	22
9	6 (29-32)	**0**	25
17	0 (0)	**0**	30
17	1 (2-4)	**0**	25
17	2 (6-8)	**0**	26
17	3 (11-13)	**0**	26
30	0 (0)	**2**	33
30	3 (11-13)	**0**	34
30	4 (15-18)	**0**	33
30	6 (29-32)	**0**	34

3.5.2 T_H-Typisierung und mRSS der Patienten mit Relapse

Wie im vorherigen Kapitel haben wir auch die T_H-Typisierung und den mRSS der Patienten mit Relapse in der Gegenüberstellung näher betrachtet. Insgesamt haben 2 Patienten, die zuerst ein klinisches Ansprechen in Bezug auf den mRSS nach o.g. Definition zeigten, im Verlauf einen Rückfall erlebt. Der mRSS-Ausgangswert zum Zeitpunkt U(0) ist in der letzten Spalte der folgenden Tabelle blau markiert. Grün symbolisiert das klinische Ansprechen, in Form einer 25% Abnahme des mRSS gegenüber U(0) an mindestens drei aufeinanderfolgenden Untersuchungszeitpunkten. Der klinische Rückfall hiernach ist rot markiert. Aufgrund der geringen Stichprobengröße ist auch hier keine Aussage über Muster in der T_H-Typisierung möglich. Jedoch zeigen beide Probanden vor ihrem klinischen Rückfall einen Wechsel von T_H0 zu T_H2.

Tabelle 15: T_H-Typisierung und mRSS der zwei Patienten mit Relapse nach initialem Ansprechen.

Proband	Zeitpunkt (Monate nach Stammzelltransplantation)	T_H-Typ	mRSS
6	0 (0)	**0**	38
6	1 (2-4)	**0**	30
6	2 (6-8)	**0**	26
6	3 (11-13)	**0**	24
6	4 (15-18)	**2**	24
6	5 (24-26)	**2**	28
6	7 (35-37)	**0**	33
7	0 (0)	**0**	13
7	1 (2-4)	**0**	9
7	5 (24-26)	**2**	6
7	6 (29-32)	**0**	9
7	7 (35-37)	**2**	11

3.5.3 T_H-Typisierung und mRSS, der vor Stammzelltransplantation T_H2-typisierten Probanden

In der folgenden Tabelle sind der T_H-Typ und der mRSS derjenigen Probanden gegenübergestellt, die vor HSCT T_H2-polarisiert waren. Es wird ersichtlich, dass 4 von 5 Patienten, die zumindest für 12 Monate einen Wechsel von T_H2 zu T_H0 zeigen, auch klinisch profitieren. Der klinische Benefit in Form einer Abnahme des mRSS ist aber beständig und unabhängig von einem erneuten Wechsel hin zu einem T_H2-Typ im Verlauf. Proband 30 zeigte keine 25% Abnahme im mRSS, obwohl zumindest ein über 30 Monate anhaltender Wechsel von T_H2 zu T_H0 zu verzeichnen ist. Bei geringer Probandenzahl ist auch hier generell kein Muster erkennbar.

Tabelle 16: T_H-Typisierung und mRSS der vor Stammzelltransplantation T_H2-typisierten Probanden

Proband	Zeitpunkt (Monate nach Stammzelltransplantation)	T_H-Typ	mRSS
16	0 (0)	**2**	40
16	1 (2-4)	**0**	29
16	2 (6-8)	**0**	27
16	3 (11-13)	**0**	23
16	4 (15-18)	**2**	23
16	5 (24-26)	**2**	20
16	6 (29-32)	**2**	18
16	7 (35-37)	**2**	18
26	0 (0)	**2**	33
26	2 (6-8)	**0**	11
26	3 (11-13)	**0**	5
26	6 (29-32)	**0**	5
28	0 (0)	**2**	40
28	1 (2-4)	**0**	28
28	2 (6-8)	**0**	29
28	3 (11-13)	**2**	21
28	7 (35-37)	**0**	22
30	0 (0)	**2**	33
30	3 (11-13)	**0**	34
30	4 (15-18)	**0**	33
30	6 (29-32)	**0**	34
33	0 (0)	**2**	26
33	2 (6-8)	**0**	17
33	3 (11-13)	**0**	18
33	5 (24-26)	**2**	12
33	6 (29-32)	**0**	9
33	7 (35-37)	**0**	10

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Proliferationsansatz hat sich im unabhängigen Mittelwertvergleich aller Messzeitpunkte als auch im abhängigen Mittelwertvergleich (V0 vs. V1) eine signifikante Abnahme der T_H2 Aktivierung, in Form der Tetanol (Tet) stimulierten Proliferation gezeigt.

Im abhängigen Vergleich zeigte sich neben der Tet stimulierten außerdem auch eine Abnahme der Scl70 stimulierten Proliferation.

In der Zytokinexpressionsuntersuchung ergab sich eine signifikante Änderung der Tet stimulierten IL-5 und IL-10 Produktion sowie der Scl70 stimulierten GM-CSF Produktion.

In der T_H-Typisierung, anhand des Zytokinmusters, zeigte kein Proband ein T_H2-Muster im Zeitraum 3-6 Monate nach HSCT gegenüber 6 Probanden im Vortransplantationszeitraum.

Die klinischen Daten ergaben eine signifikante Abnahme des Mittelwerts des mRSS 3 Monate nach HSCT gegenüber dem Zeitpunkt vor HSCT, die bis zum Ende des Untersuchungszeitraums von 3 Jahren anhielt.

Insgesamt haben 3 Probanden klinisch nicht auf die HSCT angesprochen. Diese zeigten im Verlauf kein einheitliches Muster ihres T_H-Typs.

Zwei Probanden, die zuvor klinisch angesprochen haben, haben ein Rezidiv in Bezug auf den mRSS erlebt.

Von den insgesamt 6 Probanden, die vor HSCT einen T_H2-Typ zeigten und zumindest für 6 Monate nach HSCT einen Wechsel Richtung T_H0 zeigten, haben 4 Probanden klinisch angesprochen. Von einem Probanden hatten wir keine ausreichenden Daten im Verlauf, um das klinische Ansprechen beurteilen zu können. Ein vor HSCT T_H2-typisierter Proband hat klinisch nicht angesprochen und wurde unter den Non-Responder klassifiziert.

4 Diskussion

In der Literatur ist mehrfach beschrieben, dass die SSc mit einer T_H2-Prädominanz einhergeht (Kuzumi et al., 2021, Paleja et al., 2020). Allerdings sind Untersuchungen, die den Einfluss der HSCT auf das Immunsystem, speziell auf die T_H1/T_H2 Balance untersuchen, unseres Wissens rar. Wir konnten in diesem Kontext erstmals an bis zu 33 Probanden über einen Untersuchungszeitraum von drei Jahren in zwei verschiedenen immunologischen Untersuchungen zeigen, dass die HSCT zu einer Abnahme der Aktivierung des T_H2-Weges führt und somit unseren primären Endpunkt erfüllt.

So ergaben die Ergebnisse der Proliferationsuntersuchung sowohl im abhängigen als auch im unabhängigen Mittelwertvergleich eine signifikante Abnahme der Tet als auch der Scl70 stimulierten Proliferation. Tet kann in diesem Kontext als ein T_H2-stimulierendes Antigen angesehen werden, während Scl70 ein Krankheits-spezifischeres Stimulans darstellt und die Aktivierung hierdurch eventuell als Krankheitsaktivität interpretiert werden kann. Dies steht im Einklang mit der Eingangshypothese, bei der eine T_H2-Überaktivierung vor HSCT beschrieben ist. Auffällig ist sowohl bei der Tet als auch bei der Scl70 stimulierten Proliferation, dass die beschriebenen immunologischen Veränderungen genau wie das klinische Ansprechen früh, genauer im ersten Jahr nach HSCT auftreten. Allerdings zeigen die ebenfalls untersuchte BCG und PPD stimulierte Proliferation in beiden Mittelwertvergleichen keine signifikanten Veränderungen. BCG kann als ein Maß für die Aktivierung der Makrophagen und PPD als ein Maß für die T_H1-Aktivierung angesehen werden. So lässt sich nicht erkennen, ob die Abnahme der Aktivierung des T_H2-Weges zu einer vermehrten Aktivierung des T_H1-Weges führt. Ebenso zeigt die HSCT keine statistisch signifikanten Auswirkungen auf die Makrophagen Aktivierung.

In der Zytokinexpressionsuntersuchung konnten die Ergebnisse des Proliferationsansatzes hinsichtlich einer Abnahme der T_H2-Aktivierung bestätigt werden. So wies die Tet stimulierte IL-5 Ausschüttung, repräsentativ für den T_H2-Weg, eine signifikante Änderung auf und es zeigte sich eine Abnahme insbesondere im ersten Jahr nach HSCT. Ähnlich wie in der Proliferationsanalyse

führten auch in der Zytokinexpressionsuntersuchung die beschriebenen T_H2-Veränderungen nicht zu einer vermehrten oder verminderten Aktivierung des T_H1-Weges, welcher durch PPD als Antigen und IFN-γ und TNF-β als Zytokin repräsentiert wurde.

Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit Tsukamoto et al., die u.a. ebenfalls den Einfluss der HSCT auf die T_H1/ T_H2 Balance bei 11 Patienten nach HSCT untersucht haben. Mittels durchflusszytometrischer Bestimmung von zytoplasmatischem IFN-γ und IL-4 in $CD4^+$ T-Zellen konnten sie zeigen, dass es zu einer signifikanten Zunahme des Verhältnisses von IFN-γ^+- $IL4^-$ - $CD4^+$ T-Zellen gegenüber $IL4^+$- IFN-γ^- - $CD4^+$ T-Zellen und damit zu einer Zunahme der T_H1/ T_H2 Balance einen bis 36 Monate nach HSCT kommt (Tsukamoto et al., 2011). Wir konnten nicht nur in der Antigen-stimulierten Zytokinmessung, sondern auch in der Proliferationsmessung an bis zu 33 Probanden, und damit der 3-fachen Probandenanzahl gegenüber Tuskamoto et al., zeigen, dass es zu einer Abnahme der T_H2-Aktivierung kommt, auch wenn unsere Untersuchungen, wie erwähnt, keine signifikante Zunahme des T_H1-Weges zeigen. Ein Vergleich mit weiteren Arbeiten fällt, aufgrund der geringen Anzahl an Studien, die sich speziell mit der Immunrekonstitution nach HSCT bei SSc Patienten beschäftigt haben, schwer. So konnte lediglich in zwei weiteren Untersuchungen an vier Patienten mit Non Hodgkin Lymphom (NHL) (Mukai et al., 2001) und an 12 Patienten, u.a. mit Multiplem Myelom, NHL aber auch an zwei SSc Patienten (Endo et al., 2004), gezeigt werden, dass es zu einer Zunahme des T_H1/T_H2 Verhältnisses und damit indirekt zu einer abnehmenden T_H2-Aktivierung einen Monat nach HSCT kam.

Neben der Analyse der T_H-Muster sind insbesondere die Pro- und Antiinflammation von besonderem Interesse, da diese im Pathomechanismus der Erkrankung eine wesentliche Rolle spielen (Brown and O'Reilly, 2019). Während alle proinflammatorischen Zytokine keine signifikanten Änderungen zeigten, war der antiinflammatorisch wirkenden IL-10 Produktion unter Tet Stimulation eine signifikante Änderung zu entnehmen. Insbesondere 1,5 Jahre nach HSCT fiel ein Anstieg auf. Vor dem Hintergrund, dass, wie in der Ätiopathogenese beschrieben

(Kapitel 1.5), gerade zu Beginn der Erkrankung eine Proinflammation eine wesentliche Rolle spielt (Rosendahl et al., 2022), kann der Aufbau einer Antiinflammation im Verlauf durchaus als gewünschtes Therapieziel der HSCT angesehen werden.

Der Aufbau neuer, nicht autoimmuner Immunzellen ist das wesentliche Ziel der HSCT. GM-CSF spielt in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle. Bekannt ist, dass es die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen begünstigt und zur Etablierung neuer Zellen, wie Granulozyten und Makrophagen, beiträgt (Hamilton, 2019). GM-CSF scheint aber auch eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen und entzündlichen Prozessen zu spielen (Becher et al., 2016). So fördert es die Entwicklung von Monozyten zu Makrophagen und Myofibroblasten, die eine Fibrosierung in SSc Patienten bewirken können (Binai et al., 2012). GM-CSF wird nicht nur von Monozyten und Makrophagen, sondern auch von $CD4^+$ T-Zellen und B-Effektorzellen produziert (Higashioka et al., 2020). So konnte in Mausmodellen GM-CSF produzierenden $CD4^+$ T-Zellen eine entzündliche Beteiligung u.a. bei der Entwicklung interstitieller Lungenerkrankungen nachgewiesen werden (Sendo et al., 2017). GM-CSF produzierende B-Zellen hingegen wurden reichlich in Patienten mit Multipler Sklerose gefunden (Muls et al., 2017). Interessant war dabei, dass IL-4, ein T_H2-Zytokin, die Fähigkeit besitzt, GM-CSF produzierende B-Zellen zu induzieren. Es scheint wachsende Evidenz darüber zu geben, dass GM-CSF bei der SSc, einer T_H2-prädominanten Erkrankung, eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie spielt, auch wenn die genauen Mechanismen noch unklar sind. So konnten Higashioka et al. GM-CSF produzierende B-Zellen auch bei SSc Patienten nachweisen. Weiter konnten Sie Anzeichen dafür gewinnen, dass, in Verbindung mit IL-4, GM-CSF-produzierende B-Effektorzellen die Differenzierung von $CD14^+$ Monozyten in inflammatorische dendritische Zellen bewirken (Higashioka et al., 2020). Dendritische Zellen selbst können proinflammatorische Zytokine, wie IL-6 oder TNF-α produzieren, welche in SSc Patienten die Umwandlung von Fibroblasten in Myofibroblasten fördern und somit zur Überproduktion der Extrazellulärmatrix beitragen (Affandi et al., 2018). Folgt man o.g. Erkenntnissen so sind zwei Punkte

mitentscheidend für die Differenzierung von $CD14^+$ Monozyten in inflammatorisch dendritische Zellen, zum einen IL-4, ein T_H2-Zytokin, und zum anderen GM-CSF. Wie erwähnt, konnten wir zeigen, dass es zu einer signifikanten Abnahme des T_H2-Weges nach HSCT kommt, auch wenn wir, statt dem erwähnten IL-4, als T_H2-Zytokin IL-5 gemessen haben. Gleichzeitig konnten wir auch darstellen, dass die GM-CSF Produktion unter Scl70 Stimulation signifikant im Zeitraum 3-12 Monate nach HSCT abnimmt. Möglicherweise führt die HSCT über die verminderte Ausschüttung beider Zytokine zu einer abnehmenden Aktivierung inflammatorisch dendritischer Zellen in SSc Patienten. Trotz alle dem muss betont werden, dass konkrete Studien hierzu nicht vorliegen und die Interpretation vor dem Hintergrund des komplexen Zusammenspiels der Zytokin Produktion, insbesondere unter Stimulation, allenfalls als ein möglicher Erklärungsansatz dienen kann.

Die Ergebnisse der vorgenannten Mittelwertvergleiche der Proliferation- und der Zytokinexpressionsuntersuchung haben konkrete Anhaltspunkte geliefert, dass eine abnehmende T_H2-Polarisierung nach HSCT zu verzeichnen ist. In der in Kapitel 3.3.2 durchgeführten T_H-Typisierung haben wir einen anderen Ansatz gewählt, indem jeder Proband individuell anhand eines definierten Zytokinprofils in einen T_H1-, T_H2- oder T_H0-Typ eingeteilt und keine gemittelten Werte über verschiedene Messzeitpunkte betrachtet wurden. Das hat zwar den Nachteil, dass Ausreißer in der Zytokin Produktion stärker ins Gewicht fallen, gleichzeitig aber ein individuelles Verlaufsprofil je Proband erstellt werden kann. Es konnte auch hier, in unserem sekundären Endpunkt, wie im primären Endpunkt, eine Abnahme des T_H2-Typs im Ein-Jahreszeitraum, nach HSCT, verglichen mit dem Vortransplantationszeitraum, gezeigt werden.

Betrachten man den mRSS als klinischen Marker des Ansprechens, so konnten wir 3 Monate nach HSCT einen statistisch signifikanten Abfall des mRSS nachweisen. Unsere Ergebnisse stehen hier im Einklang mit zahlreichen weiteren Studien, die ebenfalls einen unmittelbaren Effekt in Form einer Abnahme des mRSS nach HSCT beschreiben (Burt et al., 2011, Henes et al., 2012, Sullivan et al., 2018, van Laar et al., 2014). Wir konnten somit in drei immunologischen Untersuchungen zeigen, dass es deutliche Anzeichen für eine

Abnahme der T_H2-Aktivierung im ersten Jahr nach HSCT gibt. Zudem wurde eine unmittelbare Abnahme im mRSS nach HSCT deutlich. In diesem Kontext gilt es aber nochmals zu betonen, dass zwar eine T_H2-Überaktivierung in der Ätiopathogenese der Erkrankung beschrieben ist (Denton and Abraham, 2001, Hasegawa et al., 1997), es jedoch keinesfalls bewiesen ist, dass diese ursächlich für die Entwicklung der Erkrankung ist oder es gar bei einer Abnahme der T_H2-Polarisierung zu einer Besserung der Symptomatik kommt. Nichtsdestotrotz ist es zumindest naheliegend. Daher waren im explorativen Endpunkt in der Gegenüberstellung der klinischen und immunologischen Daten drei Subgruppen unseres Probandenkollektivs von besonderem Interesse. Zum einen betraf dies die Non-Responder (n=3), welche im mRSS nicht auf die HSCT angesprochen haben. Hier stellt sich die Frage nach dem Grund für das klinische Nicht-Ansprechen und ob es ggf. Gemeinsamkeiten im immunologischen Muster der Non-Responder geben könnte. Bei einer Gesamtanzahl von lediglich drei Non-Respondern konnten diese nicht gezeigt werden. Die zweite Gruppe betraf die Patienten mit Relapse (n=2). Zwei Probanden haben, trotz vorherigem klinischem Ansprechen im weiteren Verlauf einen Wiederanstieg im mRSS und damit Rückfall gezeigt. Interessanterweise zeigten beide vor dem Rückfall einen Switch von T_H0 zu T_H2. Die dritte Gruppe betraf die Probanden, welche vor HSCT eine T_H2-Polarisierung aufwiesen. Hier stellt sich die Frage, ob Patienten, die vor HSCT T_H2 polarisiert und durch die HSCT unmittelbar einen Wechsel in ihrer T_H-Polarisierung erfahren haben, auch klinisch profitierten, bzw. umgekehrt Patienten, die nach HSCT T_H2 polarisiert blieben, kein klinisches Ansprechen zeigten. Beides würde eventuell erste Hinweise auf einen tatsächlich kausalen Zusammenhang zwischen T_H2-Abnahme und klinischem Ansprechen nach HSCT liefern.

Wir konnten zeigen, dass 4 von 5 Patienten mit einem Wechsel der T_H2-Polarisierung hin zu T_H0 auch klinisch profitierten und der klinische Benefit in dieser Subgruppe, anders als bei den Patienten mit Relapse, unabhängig von einem späteren, erneuten Wechsel der T_H-Polarisierung hin zu T_H2 war. Wie bei den zuvor erwähnten Subgruppen war jedoch auch, bei den vor HSCT T_H2 polarisierten Probanden, die Probandenzahl (n=6) zu gering, um hierzu

fundiertere, allgemeingültige Aussagen treffen zu können, sodass sich an dieser Stelle auf die Einzelfallbeschreibung beschränkt wurde. Ähnliche, unmittelbar vergleichende Untersuchungen zwischen klinischen und immunologischen Daten bei SSc Patienten nach HSCT sind uns nicht bekannt, weshalb eine Einordnung und Diskussion mit anderen Studien in diesem Punkt noch aussteht.

Die LTTs in Form der beschriebenen Proliferations- und Zytokinexpressionsanalyse sind seit vielen Jahren im immunpathologischen Labor der Universitätsklinik Tübingen etabliert und es wurde nach strikten Testprotokollen vorgegangen. Die genannten Testverfahren können daher als präzise und verlässlich angesehen werden. Dennoch gilt es zu berücksichtigen, dass allgemeine Norm- und Referenzwerte, beispielsweise für die Höhe der Zytokinproduktion oder die Proliferationsstärke, weder spontan noch unter Stimulation bekannt sind. Eine inter- und intraindividuelle Variabilität kann nicht ausgeschlossen werden, welches wiederum Berücksichtigung bei Interpretation der Ergebnisse finden sollte. Follow-up Untersuchungen, wie bei einem Großteil unserer Probanden geschehen, in denen Änderungen im Zytokinmuster festgestellt werden können, kommt daher eine große Bedeutung zu. Sowohl bei der Proliferations- als auch der Zytokinexpressionsuntersuchung galt es ferner zu beachten, dass keine zu hohen oder niedrigen Antigenkonzentrationen zur Lymphozytenstimulation gewählt wurden, um eine unspezifische Aktivierung oder Inhibition zu verhindern (Klein et al., 2006). Daher wurden für jedes Antigen mindestens zwei Konzentrationsstufen gewählt. In Anlehnung an Empfehlungen des RKI bezüglich des LTT galt dabei ein SI > 2 in der Proliferationsuntersuchung als ausreichend, um von einer hinreichenden Stimulierung der Zellen auszugehen (Klein, 2002).

Einschränkend muss an dieser Stelle jedoch daraufhin gewiesen werden, dass in der Zytokinexpressionsuntersuchung jede Zytokin-Produktion über den zuvor ermittelten Normwerten (siehe *Tabelle 11*) als positive Produktion aufgefasst wurde und nicht ausgeschlossen werden kann, dass im Plasma, welches als Kultur diente, ebenfalls Zytokine in einer gewissen Anzahl vorhanden waren. Die Zytokin-Plasmakonzentration hätte streng genommen von der gemessenen Zytokin-Produktion subtrahiert werden müssen. Erst hiernach hätte man die

Zytokin-Produktion, welche einzig auf Stimulation der PBMCs zurückzuführen ist, erhalten. Da jedoch nicht von jedem Probanden die Plasmakonzentration gemessen werden konnte, wurde auf diesen Schritt zu Gunsten einer einheitlichen Methodik verzichtet.

Wir haben ausführliche Daten vor und bis zu 3 Jahre nach HSCT von insgesamt 33 Probanden in zwei verschiedenen Untersuchungen erhoben. Bedingt durch verschiedene Gründe war es allerdings nicht möglich von jedem Probanden zu jedem geplanten Messzeitpunkt vollständige Untersuchungsergebnisse zu erhalten. Dies hat die Wahl eines geeigneten statistischen Tests erschwert. Bei Vollständigkeit der Daten wäre die Wahl eines abhängigen Mittelwertvergleiches sicherlich am naheliegendsten. Dem hätten wir allerdings nur durch Ausschluss von Daten und/ oder Definition anderer Messzeitpunkte begegnen können. Beides hätte womöglich die Ergebnisse verfälscht oder wertvolle Daten außer Betracht gelassen. Durch die Unvollständigkeit der Daten haben wir eine Mischung aus einem abhängigen und unabhängigen Datensatz. Dem sind wir begegnet, indem wir in Form des Kruskal Wallis Test einen unabhängigen Mittelwertvergleich und in Form des Wilcoxon Tests einen abhängigen Mittelwertvergleich gewählt haben. Bei der Interpretation der Ergebnisse gilt jedoch immer zu beachten, dass, insbesondere beim Kruskal Wallis Test, die Messzeitpunkte eine unterschiedliche Anzahl an Probanden beinhalten.

Ferner wäre beim Kruskal Wallis Test bei globaler Signifikanz auch interessant zu wissen, wie sich die um Bonferroni-korrigierte Signifikanz im jeweils paarweisen Vergleich der Messzeitpunkte verhält, um Rückschlüsse ziehen zu können, wann es zu einer Zu- oder Abnahme der stimulierten Proliferation oder Zytokin- Produktion kommt. In Kapitel 3.2.1 und 3.3.1 wurde dies für die Messzeitpunkte T1 und Folgende mit T0 durchgeführt. So konnte gezeigt werden, welche Messzeitpunkte sich signifikant von T0, d.h. dem Zeitpunkt vor HSCT unterscheiden. Sicherlich wäre auch ein paarweiser Vergleich der restlichen Messzeitpunkte untereinander interessant, um zu überprüfen, welchen Einfluss die HSCT möglicherweise im Verlauf hat. Auch hier hätte man wieder eine um Bonferroni-korrigierte Signifikanzbetrachtung durchführen müssen, um bei multiplen Tests keine Alpha- Fehler Kumulierung zu erhalten. Dies hätte dann

bei insgesamt 28 paarweisen Vergleichen zu einem Signifikanzniveau von $p= 0.05 / 28$ in der Einzelfallbetrachtung geführt, und damit zu einer überproportionalen Zunahme falsch negativer Ergebnisse. Durch einen Vergleich der Messzeitpunkte nach HSCT mit T0 wurde sich beschränkt, nur auf die unmittelbaren Veränderungen der HSCT abzuzielen. Hier wurde ebenfalls um Bonferroni korrigiert, sodass das globale Signifikanzniveau auf $p< 0.05$ beschränkt, aber je Einzeltest $p< 0.05 / 7$ gefordert wurde. Dies hat auch in der Einzelbetrachtung noch signifikante Ergebnisse hervorgebracht.

In der vorliegenden Arbeit sind wir vereinfacht von einem klinischen Ansprechen nach HSCT ausgegangen, wenn der mRSS eine 25%-ige Verbesserung gegenüber dem Ausgangswert zum Zeitpunkt U(0) vor HSCT gezeigt hat. Entsprechende Probanden wurden in Kapitel 3.5 als Responder, bei nicht Erfüllung als Non-Responder klassifiziert. In der AST MOMA Studie war das klinische Ansprechen allerdings definiert, als 25% Verbesserung im Hautscore und/ oder Verbesserung der Lungenfunktionsparameter um 10%. Aufgrund einheitlicher Methodik wurde bei der vorliegenden Arbeit nur der Hautscore berücksichtigt und die Lungenfunktionsparameter nicht in die Bewertung des Therapieansprechens miteinbezogen.

Die vorliegende Arbeit ist, unseres Wissens, die erste Studie, welche, die bei SSc Patienten durch die HSCT hervorgerufenen, immunologischen Veränderungen mittels zweier unterschiedlicher immunologischer Tests über einen Nachbeobachtungszeitraum von 3 Jahren, untersucht. Wir konnten, trotz der erwähnten Limitationen, in beiden Untersuchungen Hinweise liefern, dass es zu einer Abnahme der T_H2-Überaktivierung nach HSCT kommt. Ferner konnten wir zeigen, dass es zu Veränderungen im pro- und antiinflammatorischen Zytokinmuster mit der Tendenz zu einer Abnahme der Proinflammation kommt. Die mehrfach beschriebene Verbesserung im mRSS nach HSCT konnten wir erneut demonstrieren. Die Korrelation der klinischen und immunologischen Daten der unterschiedlichen Subgruppen hat darüber hinaus in Einzelfallberichten erste grobe, aber dennoch interessante Hinweise geliefert. So haben alle vor HSCT T_H2 polarisierten Patienten unmittelbar nach HSCT einen Wechsel in Richtung T_H0 gezeigt. Vier von diesen fünf Patienten haben auch

klinisch profitiert. Zudem haben die Patienten mit Relapse, d.h. die Patienten, die zuerst auf die Therapie in Form einer mRSS-Abnahme angesprochen haben, unmittelbar vor ihrem klinischen Rückfall, das T_H-Muster wieder Richtung T_H2 gewandelt. Auch wenn aufgrund der geringen Anzahl an Probanden in den einzelnen Subgruppen keine allgemeingültigen Aussagen möglich sind, liefern diese Beobachtungen doch womöglich wertvolle Hinweise für nachfolgende Studien. Das Ziel muss es sein, ein Verständnis für die immunologischen Veränderungen, welche durch die HSCT hervorgerufen werden, zu erlangen, um angesichts einer doch hohen therapieassoziierten Mortalität eine bessere Patientenselektion gewährleisten zu können. Hierzu bedarf es einer weiteren Verzahnung von klinischen und immunologischen Studien.

Ein möglicher Ansatz, um zukünftig im klinischen Alltag schnell und effizient, eine Aussage über den immunologischen Subtyp in Form einer T_H-Polarisierung treffen zu können, könnte in der FACS-Analyse der PBMCs bestehen. Mittels durchflusszytometrischer, intrazellulärer Bestimmung des IL-5 / IFN-γ und/ oder IL-13 / TNF-β Quotienten könnten hierzu Aussagen getroffen werden. Durch Vergleich mit klinischen Parametern, wie der Erhebung des mRSS, die sich bereits seit langem in der Routinediagnostik von SSc Patienten etabliert haben, könnte so, neben einer klinischen Verlaufserhebung, auch ein individuelles immunologisches Profil über die Zeit erstellt werden. Der Frage, ob sich klinische Veränderungen auch in einem veränderten Immunprofil ausdrücken, könnte dann aufgrund einer größeren Datenbasis besser nachgegangen werden. Dies hätte womöglich entscheidende Auswirkung auf die Wahl der Therapie und die Patientenselektion.

5 Zusammenfassung

Die Systemische Sklerose (SSc) ist eine chronische, entzündliche Autoimmunerkrankung aus der Gruppe der Kollagenosen mit teils tödlichem Verlauf, bei der es zu einer Sklerosierung von Haut und/ oder inneren Organen kommt. Die Ätiopathogenese der Erkrankung ist weitestgehend ungeklärt (Rosendahl et al., 2022). Es scheint aber wachsende Evidenz darüber zu geben, dass die Erkrankung mit einer T_H2-Überaktivierung einhergeht (Denton and Abraham, 2001, Hasegawa et al., 1997). Die Therapie richtet sich nach der Erkrankungsausprägung. Bei Patienten mit ausgeprägtem und rasch fortschreitendem Organbefall stellt die autologe, hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT) eine effektive Therapieoption dar. Die Effektivität der Therapie konnte mittlerweile in drei großen, internationalen Studien bestätigt werden (Burt et al., 2011, Sullivan et al., 2018, van Laar et al., 2014). Allerdings liegt die therapieassoziierte Mortalität mit bis zu 12% hoch (Henes et al., 2012). Die genaue Wirkweise der HSCT bei SSc Patienten ist ungeklärt (Bagnato et al., 2022).

Wir haben in diesem Zusammenhang erstmals an bis zu 33 Patienten vor und bis zu drei Jahren nach Stammzelltransplantation immunologische Untersuchungen in Form von Lymphozytenproliferationstests (LTTs), speziell im Hinblick auf Veränderungen in der T_H1/ T_H2 Balance, sowie klinische Untersuchungen im Hinblick auf Veränderungen des modifizierten Rodnan Skin Scores (mRSS) durchgeführt. Hierzu wurde den Patienten Blut entnommen und nach Aufbereitung die Lymphozyten mit verschiedenen Antigenen, von denen bekannt ist, dass sie unterschiedliche Immunwege stimulieren, versetzt. Im Anschluss wurde in zwei unterschiedlichen Ansätzen die Proliferation- und Zytokinausschüttung der Antigen- stimulierten Lymphozyten gemessen. Als primären Endpunkt definierten wir eine Reduktion der T_H2 Polarisierung, gemessen als eine statistisch signifikante Abnahme ($p < 0.05$) der T_H-2 Antigen-stimulierten Proliferation- und / oder Zytokinexpression nach HSCT gegenüber dem Vortransplantationszeitraum. Als sekundären Endpunkt einen Wechsel des T_H2-Typs, gemessen anhand eines zuvor definierten Zytokinmusters der PBMCs

auf entsprechende Antigenstimulation, nach Transplantation gegenüber dem Vortransplantationszeitraum. Ferner wurde als explorativer Endpunkt Veränderungen im mRSS und T_H-Typ im direkten Vergleich für verschiedene Subgruppen unseres Patientenkollektivs untersucht. Es zeigte sich im primären Endpunkt im ersten Jahr nach Transplantation eine signifikante Abnahme des T_H2-Weges. Wir konnten zudem im sekundären Endpunkt zeigen, dass es im ersten Jahr nach Transplantation zu einem Verschwinden des T_H2-Typs, gegenüber sechs Probanden im Vortransplantationszeitraum, kam. Ferner haben sich Veränderungen im pro- und antiinflammatorischen Zytokinmuster gezeigt. So kam es im Verlauf nach Transplantation zu einer signifikanten Zunahme des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 und zu einer Abnahme des potenziell proinflammatorisch wirkenden Zytokins GM-CSF. In der Analyse der klinischen Daten konnte eine statistisch signifikante Abnahme des mRSS unmittelbar nach HSCT (3 Monate nach HSCT) festgestellt werden, die nachfolgend während des gesamten Untersuchungszeitraum (bis zu 3 Jahre nach HSCT) anhielt. Außerdem haben wir versucht im explorativen Endpunkt, die klinischen und immunologischen Daten zu korrelieren. In der hierzu durchgeführten Analyse verschiedener Probanden Subgruppen war auffällig, dass die Patienten, welche nach vorherigem Therapieansprechen einen Rückfall in Form eines Anstiegs im mRSS erlebt haben, unmittelbar zuvor einen Wechsel in ihrer T_H-Typisierung hin zu T_H2 gezeigt haben, auch wenn an dieser Stelle betont werden muss, dass es sich aufgrund der geringen Probandenzahl in allen zusätzlich untersuchten Subgruppen um Einzelfallberichte handelt. Des Weiteren konnten wir im Vergleich klinischer und immunologischer Daten zeigen, dass alle vor Transplantation T_H2-polarisierten Probanden unmittelbar nach Transplantation einen Wechsel in Richtung T_H0 gezeigt und vier von fünf dieser Patienten auch klinisch profitiert haben. Wir konnten mit unserer Untersuchung an bis zu 33 Probanden mit einem 3-Jährigen Follow-Up in zwei unterschiedlichen immunologischen Tests zeigen, dass es zu einer Abnahme der T_H2 Aktivierung kommt. Die Ergebnisse stimmen mit den Befundmustern von Tsukamoto et al. (2011) überein, der einzigen uns zu dem Thema bekannte Studie, welche ebenfalls den Einfluss der autologen HSCT auf die T_H1/ T_H2 Balance an 11 SSc

Patienten untersuchte. Weitere Studien, die insbesondere immunologische und klinische Daten von SSc Patienten nach Transplantation vergleichen, sind unseres Wissens nicht existent, aber angesichts der hohen therapieassoziierten Mortalität der Therapie erforderlich, um zukünftig ein besseres Verständnis der Wirkweise der Therapie zu erlangen und eine bessere Patientenselektion zu gewährleisten. Ein Ansatz, um im klinischen Alltag schnell und effizient eine Aussage über den immunologischen Subtyp zu treffen, könnte zukünftig in der routinemäßigen, durchflusszytometrischen Bestimmung der intrazellulären Zytokinproduktion bestehen. Die Frage, ob sich klinische Veränderungen bei SSc Patienten im immunologischen Muster ausdrücken, könnte dann aufgrund einer größeren Datenbasis besser beantwortet werden, was gegebenenfalls entscheidende Auswirkungen auf eine verbesserte Patientenselektion und Wahl der Therapie hätte.

6 Literaturverzeichnis

AFFANDI, A. J., CARVALHEIRO, T., RADSTAKE, T. & MARUT, W. 2018. Dendritic cells in systemic sclerosis: Advances from human and mice studies. *Immunol Lett,* 195**,** 18-29.

BAGNATO, G., VERSACE, A. G., LA ROSA, D., DE GAETANO, A., IMBALZANO, E., CHIAPPALONE, M., IOPPOLO, C., ROBERTS, W. N., BITTO, A., IRRERA, N., ALLEGRA, A., PIOGGIA, G. & GANGEMI, S. 2022. Autologous Haematopoietic Stem Cell Transplantation and Systemic Sclerosis: Focus on Interstitial Lung Disease. *Cells,* 11.

BAIRKDAR, M., ROSSIDES, M., WESTERLIND, H., HESSELSTRAND, R., ARKEMA, E. V. & HOLMQVIST, M. 2021. Incidence and prevalence of systemic sclerosis globally: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *Rheumatology (Oxford),* 60**,** 3121-3133.

BARTH, H., BERG, P. A. & KLEIN, R. 2003. Methods for the in vitro determination of an individual disposition towards TH1- or TH2-reactivity by the application of appropriate stimulatory antigens. *Clin Exp Immunol,* 134**,** 78-85.

BARTH, H., KLEIN, K., BÖRTLEIN, A., GUSEO, A., BERG, P. A., WIETHÖLTER, H. & KLEIN, R. 2002. Analysis of immunoregulatory T-helper cell subsets in patients with multiple sclerosis: relapsing-progressive course correlates with enhanced T H1, relapsing-remitting course with enhanced T H0 reactivity. *J Neuroimmunol,* 133**,** 175-83.

BECHER, B., TUGUES, S. & GRETER, M. 2016. GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. *Immunity,* 45**,** 963-973.

BERGAMASCO, A., HARTMANN, N., WALLACE, L. & VERPILLAT, P. 2019. Epidemiology of systemic sclerosis and systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. *Clin Epidemiol,* 11**,** 257-273.

BINAI, N., O'REILLY, S., GRIFFITHS, B., VAN LAAR, J. M. & HÜGLE, T. 2012. Differentiation potential of CD14+ monocytes into myofibroblasts in patients with systemic sclerosis. *PLoS One,* 7**,** e33508.

BROEN, J. C. A., RADSTAKE, T. R. D. J. & ROSSATO, M. 2014. The role of genetics and epigenetics in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Nature Reviews Rheumatology,* 10**,** 671-681.

BROWN, M. & O'REILLY, S. 2019. The immunopathogenesis of fibrosis in systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol,* 195**,** 310-321.

BURT, R. K., SHAH, S. J., DILL, K., GRANT, T., GHEORGHIADE, M., SCHROEDER, J., CRAIG, R., HIRANO, I., MARSHALL, K., RUDERMAN, E., JOVANOVIC, B., MILANETTI, F., JAIN, S., BOYCE, K., MORGAN, A., CARR, J. & BARR, W. 2011. Autologous non-myeloablative haemopoietic stem-cell transplantation compared with pulse cyclophosphamide once per month for systemic sclerosis (ASSIST): an open-label, randomised phase 2 trial. *Lancet,* 378**,** 498-506.

DE MARTINIS, M., CICCARELLI, F., SIRUFO, M. M. & GINALDI, L. 2016. An overview of environmental risk factors in systemic sclerosis. *Expert Review of Clinical Immunology,* 12**,** 465-78.

DENTON, C. P. & ABRAHAM, D. J. 2001. Transforming growth factor-beta and connective tissue growth factor: key cytokines in scleroderma pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol,* 13**,** 505-11.

DENTON, C. P. & KHANNA, D. 2017. Systemic sclerosis. *Lancet,* 390**,** 1685-1699.

DIAB, S., DOSTROVSKY, N., HUDSON, M., TATIBOUET, S., FRITZLER, M. J., BARON, M. & KHALIDI, N. 2014. Systemic sclerosis sine scleroderma: a multicenter study of 1417 subjects. *J Rheumatol,* 41**,** 2179-85.

DISTLER, O., HIGHLAND, K. B., GAHLEMANN, M., AZUMA, A., FISCHER, A., MAYES, M. D., RAGHU, G., SAUTER, W., GIRARD, M., ALVES, M., CLERISME-BEATY, E., STOWASSER, S., TETZLAFF, K., KUWANA, M. & MAHER, T. M. 2019. Nintedanib for Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease. *N Engl J Med,* 380**,** 2518-2528.

EBATA, S., YOSHIZAKI, A., OBA, K., KASHIWABARA, K., UEDA, K., UEMURA, Y., WATADANI, T., FUKASAWA, T., MIURA, S., YOSHIZAKI-OGAWA, A., ASANO, Y., OKIYAMA, N., KODERA, M., HASEGAWA, M. & SATO, S. 2021. Safety and efficacy of rituximab in systemic sclerosis (DESIRES): a double-blind, investigator-initiated, randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet Rheumatology,* 3**,** e489-e497.

EBATA, S., YOSHIZAKI, A., OBA, K., KASHIWABARA, K., UEDA, K., UEMURA, Y., WATADANI, T., FUKASAWA, T., MIURA, S., YOSHIZAKI-OGAWA, A., OKIYAMA, N., KODERA, M., HASEGAWA, M. & SATO, S. 2022. Safety and efficacy of rituximab in systemic sclerosis (DESIRES): open-label extension of a double-blind, investigators-initiated, randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet Rheumatology,* 4**,** e546-e555.

ENDO, T., SATO, N., KOIZUMI, K., NISHIO, M., FUJIMOTO, K., YAMAMOTO, S., SAKAI, T., BOHGAKI, T., SAWADA, K. & KOIKE, T. 2004. A preliminary analysis of the balance between Th1 and Th2 cells after CD34+ cell-selected autologous PBSC transplantation. *Cytotherapy,* 6**,** 337-43.

FRERIX, M., MEIER, F. M. P. & MÜLLER-LADNER, U. 2013. Auf dem Weg zur Frühdiagnose der systemischen Sklerose. *Zeitschrift für Rheumatologie,* 72**,** 954-959.

HAMILTON, J. A. 2019. GM-CSF in inflammation. *Journal of Experimental Medicine,* 217.

HARRIS, T. & HARDIN, J. W. 2013. Exact Wilcoxon Signed-Rank and Wilcoxon Mann–Whitney Ranksum Tests. *The Stata Journal,* 13**,** 337-343.

HASEGAWA, M., FUJIMOTO, M., KIKUCHI, K. & TAKEHARA, K. 1997. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol,* 24**,** 328-32.

HENES, J., OLIVEIRA, M. C., LABOPIN, M., BADOGLIO, M., SCHERER, H. U., DEL PAPA, N., DAIKELER, T., SCHMALZING, M., SCHROERS, R., MARTIN, T., PUGNET, G., SIMOES, B., MICHONNEAU, D., MARIJT, E. W. A., LIOURE, B., OLIVIER BAY, J., SNOWDEN, J. A., ROVIRA, M., HUYNH, A., ONIDA, F., KANZ, L., MARJANOVIC, Z. & FARGE, D. 2021. Autologous stem cell transplantation for progressive systemic sclerosis: a prospective non-interventional study from the European Society for Blood and Marrow Transplantation Autoimmune Disease Working Party. *Haematologica,* 106**,** 375-383.

HENES, J. & PECHER, A.-C. 2024. Zelluläre Therapien in der Behandlung der Systemischen Sklerose - Was bringen autologe Stammzelltransplantation und CAR- T Zell Therapie? *Sklero Magazin.* Sklerodermie Selbsthilfe e.v.

HENES, J. C., KOETTER, I., HORGER, M., SCHMALZING, M., MUELLER, K., EICK, C., BAUER, A., VOGEL, W. & KANZ, L. 2014. Autologous stem cell transplantation with thiotepa-based conditioning in patients with systemic sclerosis and cardiac manifestations. *Rheumatology (Oxford),* 53**,** 919-22.

HENES, J. C., SCHMALZING, M., VOGEL, W., RIEMEKASTEN, G., FEND, F., KANZ, L. & KOETTER, I. 2012. Optimization of autologous stem cell transplantation for systemic sclerosis -- a single-center longterm experience in 26 patients with severe organ manifestations. *The Journal of Rheumatology,* 39**,** 269-75.

HEROLD, G. 2018. *Innere Medizin,* Köln, Gerd Herold.

HIGASHIOKA, K., KIKUSHIGE, Y., AYANO, M., KIMOTO, Y., MITOMA, H., KIKUKAWA, M., AKAHOSHI, M., ARINOBU, Y., HORIUCHI, T., AKASHI, K. & NIIRO, H. 2020. Generation of a novel CD30(+) B cell subset producing GM-CSF and its possible link to the pathogenesis of systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol,* 201**,** 233-243.

JIN, W., ZHENG, Y. & ZHU, P. 2022. T cell abnormalities in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev,* 21**,** 103185.

KHANNA, D., FURST, D. E., CLEMENTS, P. J., ALLANORE, Y., BARON, M., CZIRJAK, L., DISTLER, O., FOELDVARI, I., KUWANA, M., MATUCCI-CERINIC, M., MAYES, M., MEDSGER, T., JR., MERKEL, P. A., POPE, J. E., SEIBOLD, J. R., STEEN, V., STEVENS, W. & DENTON, C. P. 2017. Standardization of the modified Rodnan skin score for use in clinical trials of systemic sclerosis. *J Scleroderma Relat Disord,* 2**,** 11-18.

KHANNA, D., LIN, C. J. F., FURST, D. E., GOLDIN, J., KIM, G., KUWANA, M., ALLANORE, Y., MATUCCI-CERINIC, M., DISTLER, O., SHIMA, Y., VAN LAAR, J. M., SPOTSWOOD, H., WAGNER, B., SIEGEL, J., JAHREIS, A., DENTON, C. P., LUCERO, E., PONS-ESTEL, B., RIVERO, M., TATE, G., SMITH, V., DE LANGHE, E., RASHKOV, R., BATALOV, A., GORANOV, I., STOILOV, R., DUNNE, J., JOHNSON, S. R., POPE, J. E., MARTINOVIĆ KALITERNA, D., MOGENSEN, M., OLESEN, A. B., ALLANORE, Y., HENES, J. C., MÜLLER-LADNER, U., RIEMEKASTEN, G., SKAPENKO, A., VLACHOYIANNOPOULOS, P., KISS, E., MINIER, T., BERETTA, L., GREMESE, E., MATUCCI-CERINIC, M., VALENTINI, G., ASANO, Y., ATSUMI, T., IHN, H., ISHII, T., ISHIKAWA, O., KUWANA, M., SHIMA, Y., TAKAHASHI, H., TAKEHARA, K., TANAKA, Y., YAMASAKI, Y., BUKAUSKIENE, L., BUTRIMIENE, I., MEDRANO RAMIREZ, G., RAMOS-REMUS, C., SOFIA RODRIGUEZ REYNA, T., DE VRIES-BOUWSTRA, J., VAN LAAR, J. M., BATKO, B., JEKA, S., KUCHARZ, E., MAJDAN, M., OLESINSKA, M., SMOLENSKA, Z., ALVES, J., SANTOS, M., MIHAI, C. M., REDNIC, S., CASTELLVI BARRANCO, I., LOPEZ LONGO, F. J., SIMEON AZNAR, C., CARREIRA, P., DISTLER, O., WALKER, U. A., DERRETT-SMITH, E., GRIFFITHS, B., MCKAY, N., DENTON, C. P., AELION, J., BOROFSKY, M., FLEISCHMANN, R., FORSTOT, J. Z., FURST, D. E., KAFAJA, S., KHAN, M. F., KHANNA, D., KOHEN, M. D., MARTIN, R. W., MENDOZA-BALLESTEROS, F., NAMI, A., PANG, S., RIOS, G., SIMMS, R., SULLIVAN, K. M. & STEEN, V. D. 2020. Tocilizumab in systemic sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Respiratory Medicine,* 8**,** 963-974.

KLEIN, R. 2002. Dia gnostische Relevanz des Lymphozytentransformationstest in der Umweltmedizin. *Umweltmed Forsch Prax,* 8**,** 473-8.

KLEIN, R., SCHWENK, M. & TEMPLETON, D. M. 2006. Cytokine profiles in human exposure to metals (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry,* 78**,** 2155-2168.

KOWAL-BIELECKA, O., FRANSEN, J., AVOUAC, J., BECKER, M., KULAK, A., ALLANORE, Y., DISTLER, O., CLEMENTS, P., CUTOLO, M., CZIRJAK, L., DAMJANOV, N., DEL GALDO, F., DENTON, C. P., DISTLER, J. H. W., FOELDVARI, I., FIGELSTONE, K., FRERIX, M., FURST, D. E., GUIDUCCI, S., HUNZELMANN, N., KHANNA, D., MATUCCI-CERINIC, M., HERRICK, A. L., VAN DEN HOOGEN, F., VAN LAAR, J. M., RIEMEKASTEN, G., SILVER, R., SMITH, V., SULLI, A., TARNER, I., TYNDALL, A., WELLING, J., WIGLEY, F., VALENTINI, G., WALKER, U. A., ZULIAN, F. & MÜLLER-LADNER, U. 2017. Update of EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases,* 76**,** 1327-1339.

KUZUMI, A., YOSHIZAKI, A., MATSUDA, K. M., KOTANI, H., NORIMATSU, Y., FUKAYAMA, M., EBATA, S., FUKASAWA, T., YOSHIZAKI-OGAWA, A., ASANO, Y., MORIKAWA, K., KAZOE, Y., MAWATARI, K., KITAMORI, T. & SATO, S. 2021. Interleukin-31 promotes fibrosis and T helper 2 polarization in systemic sclerosis. *Nat Commun,* 12**,** 5947.

MCCOMB, S., THIRIOT, A., AKACHE, B., KRISHNAN, L. & STARK, F. 2019. Introduction to the Immune System. *Methods Mol Biol,* 2024**,** 1-24.

MOSMANN, T. R., CHERWINSKI, H., BOND, M. W., GIEDLIN, M. A. & COFFMAN, R. L. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol,* 136**,** 2348-57.

MUELLER, K. A., MUELLER, II, EPPLER, D., ZUERN, C. S., SEIZER, P., KRAMER, U., KOETTER, I., ROECKEN, M., KANDOLF, R., GAWAZ, M., GEISLER, T., HENES, J. C. & KLINGEL, K. 2015. Clinical and histopathological features of patients with systemic sclerosis undergoing endomyocardial biopsy. *PLoS One,* 10**,** e0126707.

MUKAI, M., BOHGAKI, T., KONDO, M., NOTOYA, A. & KOHNO, M. 2001. Changes in the T-helper cell 1/T-helper cell 2 balance of peripheral T-helper cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Hematol,* 80**,** 715-21.

MULS, N., NASR, Z., DANG, H. A., SINDIC, C. & VAN PESCH, V. 2017. IL-22, GM-CSF and IL-17 in peripheral CD4+ T cell subpopulations during multiple sclerosis relapses and remission. Impact of corticosteroid therapy. *PLoS One,* 12**,** e0173780.

MURPHY, K. & WEAVER, C. 2018. *Janeway Immunologie,* Berlin, Springer.

PALEJA, B., LOW, A. H. L., KUMAR, P., SAIDIN, S., LAJAM, A., NUR HAZIRAH, S., CHUA, C., LI YUN, L. & ALBANI, S. 2020. Systemic Sclerosis Perturbs the Architecture of the Immunome. *Front Immunol,* 11**,** 1602.

PERELAS, A., SILVER, R. M., ARROSSI, A. V. & HIGHLAND, K. B. 2020. Systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. *The Lancet Respiratory Medicine,* 8**,** 304-320.

POORMOGHIM, H., LUCAS, M., FERTIG, N. & MEDSGER, T. A., JR. 2000. Systemic sclerosis sine scleroderma: demographic, clinical, and serologic features and survival in forty-eight patients. *Arthritis Rheum,* 43**,** 444-51.

ROSENDAHL, A. H., SCHÖNBORN, K. & KRIEG, T. 2022. Pathophysiology of systemic sclerosis (scleroderma). *Kaohsiung J Med Sci,* 38**,** 187-195.

SENDO, S., SAEGUSA, J., OKANO, T., TAKAHASHI, S., AKASHI, K. & MORINOBU, A. 2017. CD11b+Gr-1(dim) Tolerogenic Dendritic Cell-Like Cells Are Expanded in Interstitial Lung Disease in SKG Mice. *Arthritis Rheumatol,* 69**,** 2314-2327.

SINGH, V. K., MEHROTRA, S. & AGARWAL, S. S. 1999. The paradigm of Th1 and Th2 cytokines: its relevance to autoimmunity and allergy. *Immunol Res,* 20**,** 147-61.

SULLIVAN, K. M., GOLDMUNTZ, E. A., KEYES-ELSTEIN, L., MCSWEENEY, P. A., PINCKNEY, A., WELCH, B., MAYES, M. D., NASH, R. A., CROFFORD, L. J., EGGLESTON, B., CASTINA, S., GRIFFITH, L. M., GOLDSTEIN, J. S., WALLACE, D., CRACIUNESCU, O., KHANNA, D., FOLZ, R. J., GOLDIN, J., ST CLAIR, E. W., SEIBOLD, J. R., PHILLIPS, K., MINEISHI, S., SIMMS, R. W., BALLEN, K., WENER, M. H., GEORGES, G. E., HEIMFELD, S., HOSING, C., FORMAN, S., KAFAJA, S., SILVER, R. M., GRIFFING, L., STOREK, J., LECLERCQ, S., BRASINGTON, R., CSUKA, M. E., BREDESON, C., KEEVER-TAYLOR, C., DOMSIC, R. T., KAHALEH, M. B., MEDSGER, T. & FURST, D. E. 2018. Myeloablative Autologous Stem-Cell Transplantation for Severe Scleroderma. *The New England Journal of Medicine,* 378**,** 35-47.

TASHKIN, D. P., ELASHOFF, R., CLEMENTS, P. J., GOLDIN, J., ROTH, M. D., FURST, D. E., ARRIOLA, E., SILVER, R., STRANGE, C., BOLSTER, M., SEIBOLD, J. R., RILEY, D. J., HSU, V. M., VARGA, J., SCHRAUFNAGEL, D. E., THEODORE, A., SIMMS, R., WISE, R., WIGLEY, F., WHITE, B., STEEN, V., READ, C., MAYES, M., PARSLEY, E., MUBARAK, K., CONNOLLY, M. K., GOLDEN, J., OLMAN, M., FESSLER, B., ROTHFIELD, N. & METERSKY, M. 2006a. Cyclophosphamide versus placebo in scleroderma lung disease. *N Engl J Med,* 354**,** 2655-66.

TASHKIN, D. P., ELASHOFF, R., CLEMENTS, P. J., GOLDIN, J., ROTH, M. D., FURST, D. E., ARRIOLA, E., SILVER, R., STRANGE, C., BOLSTER, M., SEIBOLD, J. R., RILEY, D. J., HSU, V. M., VARGA, J., SCHRAUFNAGEL, D. E., THEODORE, A., SIMMS, R., WISE, R., WIGLEY, F., WHITE, B., STEEN, V., READ, C., MAYES, M., PARSLEY, E., MUBARAK, K., CONNOLLY, M. K., GOLDEN, J., OLMAN, M., FESSLER, B., ROTHFIELD, N. & METERSKY, M. 2006b. Cyclophosphamide versus placebo in scleroderma lung disease. *The New England Journal of Medicine,* 354**,** 2655-66.

TASHKIN, D. P., ROTH, M. D., CLEMENTS, P. J., FURST, D. E., KHANNA, D., KLEERUP, E. C., GOLDIN, J., ARRIOLA, E., VOLKMANN, E. R., KAFAJA, S., SILVER, R., STEEN, V., STRANGE, C., WISE, R., WIGLEY, F., MAYES, M., RILEY, D. J., HUSSAIN, S., ASSASSI, S., HSU, V. M., PATEL, B., PHILLIPS, K., MARTINEZ, F., GOLDEN, J., CONNOLLY, M. K., VARGA, J., DEMATTE, J., HINCHCLIFF, M. E., FISCHER, A., SWIGRIS, J., MEEHAN, R., THEODORE, A., SIMMS, R., VOLKOV, S., SCHRAUFNAGEL, D. E., SCHOLAND, M. B., FRECH, T., MOLITOR, J. A., HIGHLAND, K., READ, C. A., FRITZLER, M. J., KIM, G. H. J., TSENG, C. H. & ELASHOFF, R. M. 2016. Mycophenolate mofetil versus oral cyclophosphamide in scleroderma-related interstitial lung disease (SLS II): a randomised controlled, double-blind, parallel group trial. *Lancet Respir Med,* 4**,** 708-719.

TSUKAMOTO, H., NAGAFUJI, K., HORIUCHI, T., MITOMA, H., NIIRO, H., ARINOBU, Y., INOUE, Y., TO, K., MIYAMOTO, T., IWASAKI, H., TESHIMA, T., HARADA, M. & AKASHI, K. 2011. Analysis of immune reconstitution after autologous CD34+

stem/progenitor cell transplantation for systemic sclerosis: predominant reconstitution of Th1 CD4+ T cells. *Rheumatology (Oxford),* 50**,** 944-52.

VAN DEN HOOGEN, F., KHANNA, D., FRANSEN, J., JOHNSON, S. R., BARON, M., TYNDALL, A., MATUCCI-CERINIC, M., NADEN, R. P., MEDSGER, T. A., JR., CARREIRA, P. E., RIEMEKASTEN, G., CLEMENTS, P. J., DENTON, C. P., DISTLER, O., ALLANORE, Y., FURST, D. E., GABRIELLI, A., MAYES, M. D., VAN LAAR, J. M., SEIBOLD, J. R., CZIRJAK, L., STEEN, V. D., INANC, M., KOWAL-BIELECKA, O., MÜLLER-LADNER, U., VALENTINI, G., VEALE, D. J., VONK, M. C., WALKER, U. A., CHUNG, L., COLLIER, D. H., ELLEN CSUKA, M., FESSLER, B. J., GUIDUCCI, S., HERRICK, A., HSU, V. M., JIMENEZ, S., KAHALEH, B., MERKEL, P. A., SIERAKOWSKI, S., SILVER, R. M., SIMMS, R. W., VARGA, J. & POPE, J. E. 2013. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis,* 72**,** 1747-55.

VAN LAAR, J. M., FARGE, D., SONT, J. K., NARAGHI, K., MARJANOVIC, Z., LARGHERO, J., SCHUERWEGH, A. J., MARIJT, E. W., VONK, M. C., SCHATTENBERG, A. V., MATUCCI-CERINIC, M., VOSKUYL, A. E., VAN DE LOOSDRECHT, A. A., DAIKELER, T., KÖTTER, I., SCHMALZING, M., MARTIN, T., LIOURE, B., WEINER, S. M., KREUTER, A., DELIGNY, C., DURAND, J. M., EMERY, P., MACHOLD, K. P., SARROT-REYNAULD, F., WARNATZ, K., ADOUE, D. F., CONSTANS, J., TONY, H. P., DEL PAPA, N., FASSAS, A., HIMSEL, A., LAUNAY, D., LO MONACO, A., PHILIPPE, P., QUÉRÉ, I., RICH, É., WESTHOVENS, R., GRIFFITHS, B., SACCARDI, R., VAN DEN HOOGEN, F. H., FIBBE, W. E., SOCIÉ, G., GRATWOHL, A. & TYNDALL, A. 2014. Autologous hematopoietic stem cell transplantation vs intravenous pulse cyclophosphamide in diffuse cutaneous systemic sclerosis: a randomized clinical trial. *Journal of the American Medical Association,* 311**,** 2490-8.

WALKER, U. A., TYNDALL, A., CZIRJÁK, L., DENTON, C., FARGE-BANCEL, D., KOWAL-BIELECKA, O., MÜLLER-LADNER, U., BOCELLI-TYNDALL, C. & MATUCCI-CERINIC, M. 2007. Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials And Research group database. *Ann Rheum Dis,* 66**,** 754-63.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Abteilung für Rheumatologie der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Henes in Zusammenarbeit mit der Abteilung für klinischen Immunologie unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Klein durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Frau Dr. Pecher. Sie verfasste den Ethikantrag und reichte diesen bei der Ethikkommission ein. Die HSCTs wurden von ärztlichem Personal o.g. Abteilung zwischen 2013 und 2020 durchgeführt. Hierzu gehörten ebenfalls die Blutentnahmen für die Lymphozytentransformationstests. Die Tests selbst wurden von medizinisch-technischem Personal des immunpathologischem Labores unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Klein durchgeführt und die Ergebnisse automatisiert in Excel übertragen.

Die Datensortierung per Excel und die anschließende Auswertung mittels des Statistikprogramms SPSS basieren in Rücksprache mit dem betreuenden Personal auf meinen Ideen und erfolgten ebenso durch mich. Alle Texte, Abbildungen und Tabellen wurden ausschließlich durch mich erstellt und verfasst.

Hiermit versichere ich, Johannes Konrad Olschner, die Dissertation selbstständig verfasst und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 26.01.2025

8 Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Henes und Frau Professorin Dr. Klein für ihre außerordentlich gute Betreuung, konstruktive Kritik und nicht zuletzt für die Ermöglichung dieser Arbeit bedanken. Ich werde dies stets zu schätzen wissen.

Bei Frau Dr. Pecher möchte ich mich für die inhaltliche Einarbeitung in die Thematik sowie die fundierte und schnelle Beantwortung etwaiger Fragen bedanken. Ohne Ihre hervorragende Unterstützung wäre die Erstellung der Dissertation deutlicher schwieriger gewesen.

Bei Frau Plankenhorn, die über all die Jahre mit großer Sorgfalt und Akribie, die Lymphozytentransformationstests im immunpathologischen Labor des Universitätsklinikum durchführte, möchte ich mich für die Durchführung und Beantwortung methodisch- technischer Fragen bedanken.

Dr. Kathrin Reichmann möchte ich für Ihren Zuspruch, Ihre fortwährende Motivation und Ihre Ratschläge in statistischen Fragestellungen danken. Ebenso geht mein Dank an Pascal Topolewski für seine Hilfestellung bei Fragen zu Excel.

Abschließend gebührt meinen Eltern für Ihren moralischen Beistand, Ihre Ermutigungen und Ihre uneingeschränkte Unterstützung, auf die ich mich jederzeit verlassen kann, mein größter Dank. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

Tübingen, im Winter 2025