

# **Die Manipulation inflammatorischer Monozyten reduziert die Entwicklung dermalen Fibrose**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von  
Jessica Haub  
geb. am 20.01.1991 in Mainz

Mainz, 20. Dezember 2019

Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.2020

**Eidesstattliche Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, Jessica Haub, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer, als der angegebenen Hilfsmittel, angefertigt habe. Alles aus Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Diese Doktorarbeit wurde in ähnlicher Form bei keiner anderen Hochschule eingereicht.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

**Teile dieser Arbeit wurden publiziert:**

Haub, J. *et al.* Intervention of Inflammatory Monocyte Activity Limits Dermal Fibrosis. *J. Invest. Dermatol.* **139**, 2144–2153 (2019).

Für meine Familie

# Inhaltsverzeichnis

|  |       |    |
|--|-------|----|
| I. Veröffentlichungen  | ..... |    |
| 1. Einleitung  | ..... | 1  |
| 1.1 Die Haut als immunologisches Organ                             | ..... | 1  |
| 1.1.1 Myeloide Zelltypen in der Haut und ihre Rolle in der Fibrose | ..... | 1  |
| 1.1.2 Monozyten  | ..... | 2  |
| 1.1.3 Makrophagen  | ..... | 5  |
| 1.1.4 Dendritische Zellen  | ..... | 7  |
| 1.1.5 Periphere regulatorische T-Zellen                            | ..... | 7  |
| 1.1.6 Myeloide Zellrekrutierung                                    | ..... | 8  |
| 1.1.7 Klassifizierung der Chemokine und das Chemokinrezeptorsystem | ..... | 10 |
| 1.2 Systemische Sklerose   | ..... | 11 |
| 1.2.1 Epidemiologie und klinische Pathologie                       | ..... | 11 |
| 1.2.2 Fibrose  | ..... | 12 |
| 1.2.3 Immunologische Mechanismen der Fibrose                       | ..... | 12 |
| 1.2.4 Experimentelle Modelle der systemischen Sklerose             | ..... | 15 |
| 1.2.4.1 Induziertes Mausmodell: HOCl-Modell                        | ..... | 15 |
| 1.2.4.2 Spontanes Mausmodell: Fra-2                                | ..... | 16 |
| 1.3 Ziele der Arbeit   | ..... | 17 |
| 2. Material und Methode  | ..... | 18 |
| 2.1. Material  | ..... | 18 |
| 2.1.1. Laborgeräte und Verbrauchsmaterial                          | ..... | 18 |
| 2.1.2. Chemikalien/Medikamente/Enzyme                              | ..... | 19 |
| 2.1.3. Antikörper  | ..... | 21 |
| 2.1.3.1. Durchflusszytometrie                                      | ..... | 21 |
| 2.1.3.2. Histologie  | ..... | 23 |
| 2.1.4. Puffer und verwendete Kits                                  | ..... | 23 |
| 2.1.5. Depletierende Antikörper                                    | ..... | 24 |
| 2.1.6. Synthetische Oligonukleotide                                | ..... | 24 |
| 2.1.7. Versuchstiere   | ..... | 25 |
| 2.2. Methoden  | ..... | 26 |
| 2.2.1. HOCl-induzierte dermale Fibrose                             | ..... | 26 |
| 2.2.1.1. Experimenteller Aufbau                                    | ..... | 26 |
| 2.2.2. Zucht und Typisierung der Fra-2-Mäuse                       | ..... | 26 |
| 2.2.3. Organentnahmen  | ..... | 26 |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 2.2.3.1.  | <b>Gewinnung und enzymatische Aufarbeitung der Hautstanzen</b> .....                                      | 26        |
| 2.2.3.2.  | <b>Gewinnung und Aufarbeitung der axillären/zervikalen Lymphknoten</b> .....                              | 27        |
| 2.2.3.3.  | <b>Gewinnung und Aufarbeitung des Knochenmarks</b> .....  | 28        |
| 2.2.3.4.  | <b>Blutgewinnung und Lyse</b> .....   | 28        |
| 2.2.4.    | <b>Aufarbeitung Vollblut</b> .....  | 29        |
| 2.2.5.    | <b>Hämozytometrische Zellzahlbestimmung</b> .....   | 29        |
| 2.2.6.    | <b>Durchflusszytometrie</b> .....   | 29        |
| 2.2.6.1.  | <b>Extrazelluläre Färbung</b> .....   | 30        |
| 2.2.6.2.  | <b>Intrazelluläre Färbung</b> .....   | 30        |
| 2.2.6.3.  | <b>Intranukleäre Färbung</b> .....  | 30        |
| 2.2.6.4.  | <b>T-SNE Analyse von Durchflusszytometrischen Daten</b> .....   | 31        |
| 2.2.7.    | <b>Histologie</b> .....   | 31        |
| 2.2.8.    | <b>Quantitative RealTime Polymerasekettenreaktion</b> .....   | 32        |
| 2.2.8.1.  | <b>RNA Isolation</b> .....  | 32        |
| 2.2.8.2.  | <b>cDNA- Synthese</b> .....   | 32        |
| 2.2.8.3.  | <b>Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)</b> .....  | 33        |
| 2.2.9.    | <b>Statistik</b> .....  | 34        |
| <b>3.</b> | <b>Ergebnisse</b> .....   | <b>35</b> |
| 3.1.      | <b>Analyse pro-fibrotischer und fibrotischer Parameter nach Depletion im induzierten Mausmodell</b> ..... | <b>35</b> |
| 3.1.1.    | <b>Kontrolle der Depletionseffizienz</b> .....  | <b>36</b> |
| 3.1.2.    | <b>Myofibroblastenaktivierung in der Haut</b> .....   | <b>37</b> |
| 3.1.3.    | <b>Histologische Bestimmung des Kollagengehalts der Haut</b> .....  | <b>38</b> |
| 3.1.4.    | <b>Analyse des kutanen zellulären Infiltrates nach Depletion im induzierten Mausmodell</b> .....          | <b>39</b> |
| 3.1.4.1   | <b>Zelluläre Infiltration der Haut</b> .....  | <b>40</b> |
| 3.1.4.2   | <b>Genexpressionsanalyse der Haut</b> .....   | <b>44</b> |
| 3.2.      | <b>CCR2 vermittelte Rekrutierung von monozytären Zellen in der fibrotischen Haut</b> 46                   |           |
| 3.2.1.    | <b>Analyse des dermalen Infiltrats in CCR2 KO Tieren</b> .....  | <b>46</b> |
| 3.2.2.    | <b>Analyse des Kollagengehalts in der Haut</b> .....  | <b>48</b> |
| 3.3.      | <b>Fibroseentwicklung im spontanen Fra-2-Mausmodell</b> .....   | <b>49</b> |
| 3.3.1.    | <b>Monozyten in fibrotischer Haut</b> .....   | <b>49</b> |
| 3.3.2.    | <b>Analyse der Hautfibrose</b> .....  | <b>51</b> |
| 3.4.      | <b>L-RNA Aptamer Blockade des CCR2/CCL2 Signalweges im induzierten und spontanen Mausmodell</b> .....     | <b>52</b> |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 3.4.1.  | Durchflusszytometrische Analysen der Haut .....   | 53 |
| 3.4.1.1 | Durchflusszytometrische Analysen der Haut im induzierten Mausmodell<br>53                   |    |
| 3.4.1.2 | Durchflusszytometrische Analysen der Haut im spontanen Mausmodell<br>54                     |    |
| 3.4.2.  | Untersuchung der kutanen Fibroseentwicklung .....   | 55 |
| 3.4.2.1 | Untersuchung der kutanen Fibroseentwicklung im induzierbaren<br>Mausmodell.....             | 56 |
| 3.4.2.2 | Untersuchung der kutanen Fibroseentwicklung im spontanen<br>Mausmodell.....                 | 56 |
| 3.5.    | Die Funktion der Milz als Reservoir monozytärer Zellen für die dermale<br>Fibrose .....     | 57 |
| 3.5.1.  | Durchflusszytometrische Analysen der dermalen Infiltration .....                            | 57 |
| 3.5.2.  | Histologische Bestimmung des Kollagengehalts .....  | 59 |
| 3.6.    | Regulatorische T-Zellen in der dermalen Fibrose .....                                       | 60 |
| 3.6.1.  | T-Zell-Diversität in fibrotischer Haut.....   | 60 |
| 3.6.2.  | Regulatorische T-Zellen in induzierter und sich spontan-entwickelnder<br>Haut-Fibrose ..... | 62 |
| 3.7.    | Monozytenzusammensetzung im Vollblut von Sklerodermiepatienten .....                        | 63 |
| 3.7.1.  | Studiendesign .....   | 63 |
| 3.7.2.  | Charakterisierung der Patienten- und Probandenkohorte .....                                 | 63 |
| 3.7.3.  | Durchflusszytometrische Analysen zirkulierender Monozyten in Blut....                       | 65 |
| 3.7.4.  | Korrelationsanalysen.....   | 69 |
| 3.7.5.  | Abschließende Zusammenfassung.....  | 71 |
| 4.      | Diskussion.....   | 72 |
| 4.1.    | Monozyten: Die Schlüsselzellen der dermalen Fibrose .....                                   | 72 |
| 4.2.    | Mainpulation der frühen Inflammation als therapeutisches Ziel .....                         | 79 |
| 5.      | Zusammenfassung .....   | 85 |
| 6.      | Summary.....  | 86 |
| 7.      | Literaturverzeichnis.....   | 88 |
| II.     | Abbildungsverzeichnis .....   | 92 |
| III.    | Tabellensverzeichnis.....   | 93 |
| IV.     | Abkürzungen.....  | 94 |

## I. Veröffentlichungen

### Originalpublikationen

**Haub J**, Roehrig N, Uhrin P, Schabbauer G, Eulberg D, Melchior F, et al. Intervention of Inflammatory Monocyte Activity Limits Dermal Fibrosis. *J Invest Dermatol.* 2019 Oct 1;139(10):2144–53.

Haerberle S, Raker V, **Haub J**, Kim YO, Weng S-Y, Yilmaz OK, et al. Regulatory T cell deficient scurfy mice exhibit a Th2/M2-like inflammatory response in the skin. *J Dermatol Sci.* 2017 Sep 1;87(3):285–91.

Raker VK, Yong Ook K, **Haub J**, Lorenz N, Schmidt T, Stegemann A, et al. Myeloid cell populations and fibrogenic parameters in bleomycin- and HOCl-induced fibrosis. *Exp Dermatol.* 2016 Jun 1; 25:887-894.

Mimmler M, Peter S, Kraus A, Stroh S, Nikolova T, Seiwert N, **Haub J**, et al. DNA damage response curtails detrimental replication stress and chromosomal instability induced by the dietary carcinogen PhIP. *Nucleic Acids Res.* 2016 Dec 1;44(21):10259–76.

### Reviews

Raker V, **Haub J**, Stojanovic A, Cerwenka A, Schuppan D, Steinbrink K. Early inflammatory players in cutaneous fibrosis. *J Dermatol Sci.* 2017 Sep 1;87(3):228–35.

### Kongressbeiträge (Vorträge)

**J.Haub**: Pathogenic role of CD11b<sup>+</sup> and Ly6C<sup>+</sup> myeloid cells in chemically induced mouse models of dermal fibrosis. (DGFI, Deutsche Gesellschaft für Immunologie, September 2017). published: *European Journal of Immunology (EJI)*. Ausgabe 47, Suppl.2;1-333, Seite 24

**J.Haub**: Early manipulation of monocytic phagocytes limits dermal fibrosis. (*Novel Concepts in Innate Immunity* June 2019).

## 1. Einleitung

Im Jahr 1753 wurde zum ersten Mal von dem neapolitanischen Arzt Carlo Cruzio der Fall einer Patientin dokumentiert, die Symptome wie Verdickung der Haut, Enge im Mund und Verdickungen um den Hals aufwies. Es dauerte weitere 94 Jahre bis eine Erkrankung durch den französischen Arzt Elie Gintrac klassifiziert wurde, welche als reine Hauterkrankung „Sklerodermie“ – altgriechisch „Hart“ und „Haut“ bezeichnet wurde. Im Jahr 1945 wurde zum ersten Mal eine Organbeteiligung mit der Hautfibrosierung in Zusammenhang gebracht und als „progressive systemische Sklerose“ bezeichnet. Da die Ursache der Erkrankung nicht bekannt ist, gibt es bislang keine Kausaltherapie und die Standardbehandlung sieht derzeit eine symptomatische Behandlung mit Immunsuppressiva vor, welche die Funktion des Immunsystems herabsetzt. Aufgrund des Fehlens einer Kausaltherapie ist es vom großen Interesse die Pathomechanismen der Frühphase der Erkrankung besser zu verstehen und so mögliche frühe Interventionsziele identifizieren zu können<sup>1</sup>.

### 1.1 Die Haut als immunologisches Organ

Über eine Fläche von eineinhalb bis zwei Quadratmetern erweist sich die Haut als größtes menschliches Organ und übernimmt neben Ihrer Stützfunktion wichtige Aufgaben in der Abwehr von Infektionen, Pathogenen und chemischen Umwelteinflüssen und dem Schutz vor Wasserverlust und der Wärmerespiration<sup>1,2</sup>. Die menschliche Haut besteht aus der Epidermis, die die äußerste Hautschicht ist. Sie untergliedert sich in *Stratum corneum*, *Stratum granulosum*, *Stratum spinosum* und *Stratum basale*. Die Epidermis ist strukturell über die Basalschicht mit der darunter gelegenen Dermis verbunden. Die Dermis besteht aus einem dicht gepackten Bindegewebe, welches aus homotypischen Fibrillen des Kollagen-Typs I und Elastinfasern zusammengesetzt ist. Bei entzündlichen Vorgängen werden Immunzellen über das Blutgefäß in die Haut rekrutiert und umfassen Vorläuferzellen wie Monozyten von dendritischen Zellen (DCs) und Makrophagen, sowie Neutrophile und T-Zellen<sup>1</sup>.

#### 1.1.1 Myeloide Zelltypen in der Haut und ihre Rolle in der Fibrose

Das myeloide Zellkompartiment, welches sich aus Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen (DCs) und Mastzellen zusammensetzt, ist nicht nur für die erste Immunbarriere relevant, sondern dirigiert auch die Signalgebung zwischen angeborener und adaptiver Immunität. Myeloide Zellen beeinflussen ebenfalls die Differenzierung benachbarter Zellen und modulieren lokale gewebespezifische Signalwege<sup>3</sup>. Die ersten Zellen, die an einen Infektionsort gelangen sind Phagozyten (Entzündung). Neutrophile Granulozyten

phagozytieren Pathogene und zerstören sie in intrazellulären Vesikeln durch bakterizide Substanzen, wie z.B. Defensine, Phospholipase und Lysozyme. Jedoch beeinflussen Neutrophile auch die Aktivität zahlreicher Prozesse in den folgenden Heilungsprozessen der Haut (Resolution). Neutrophile regulieren die Expressionsmuster bestimmter Gene, die an der Angiogenese beteiligt sind, wodurch sie entzündliche Zytokine Fibroblasten und Keratinozyten zur Proliferation antreiben. Eosinophile Granulozyten werden spezifisch durch Interleukin 5 (IL-5) reguliert und sind vorwiegend an der Wundheilung beteiligt. Des Weiteren sind Eosinophile eine primäre Quelle für TGF- $\beta$ , ein entscheidender Treiber von Fibroblasten zu Myofibroblasten in der Systemischen Sklerose<sup>4</sup>. Weiterführend können Eosinophile leicht an Fibroblasten binden, was zur Freisetzung von Mitogenen führt, die die Fibroblastenproliferation und die Kollagenproduktion steigern<sup>5</sup>. Eine weitere Gruppe der myeloiden Zelltypen sind die Mastzellen. Sie schütten Enzyme und toxische Substanzen aus, um Erreger zu töten. Innerhalb der Fibrose scheinen sie Zytokine und Wachstumsfaktoren zu sekretieren, welche die Endothelzellen und Fibroblasten aktivieren. Aufgrund verschiedener Faktoren wandern Monozyten in die Haut ein, die im Gewebe zu Makrophagen oder DCs differenzieren. Die Differenzierung nach dem Eintritt ins Gewebe hängt von der Mikroumgebung und ihren Stimuli ab, z.B. IL-4, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ . In der Fibrose werden unkontrolliert „Wundheilungs-spezifische“ Makrophagen aktiviert. Diese wiederum verursachen eine Aktivierung von Myofibroblasten und eine übermäßige Synthese von extrazellulären Matrixproteinen<sup>6,7</sup>. Durch die anhaltende Expression von TGF- $\beta$ 1 und durch die Veränderung der Balance von ECM (extrazellulären Matrixproteinen) -Stoffwechsel zu ECM-Ablagerung und -Ansammlung entwickelt sich das fibrotische Gewebe<sup>8</sup>.

### 1.1.2 Monozyten

Monozyten sind Mitglieder des mononukleär-phagozytären System (MPS), eine Familie von myeloiden Zellen, die Monozyten, konventionelle DCs und Makrophagen umfassen<sup>9</sup>. Blutmonozyten machen 10% der peripheren Leukozyten beim Menschen und 4% bei Mäusen aus<sup>3</sup>. Bevor sie im Blut erscheinen, stammen Monozyten von Makrophagen- und DC - Vorläuferzellen (MDP) ab. Daraus entwickeln sich Monozyten-Vorläuferzellen (cMoPs), die als Monozyten bei einer geringen CXC-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) Expression, aus dem Knochenmark in das Blut migrieren. Neben einer geringen CXCR4 Expression, ist eine hohe CCR2 und geringe Nur77 (NR4 $\alpha$ 1-Nuklear-Rezeptor) Expression notwendig. Ein Hauptmerkmal, das Monozyten von anderen Mitgliedern der MPS auszeichnet ist, dass sie schnell in großer Zahl an entzündete Stellen mobilisiert werden können. Dort sind sie als besonders plastische „Not-Einheit“ bereit, weiter zu differenzieren, um entzündungshemmende oder auflösende Aktivitäten zu übernehmen<sup>3</sup>. Monozyten rekrutieren

nicht nur aus dem Knochenmark. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Milz ein wichtiges Reservoir für Monozyten darstellt. Monozyten aus der Milz ähneln in der Morphologie, im Transkriptom und ihrer phagozytierende Funktion sehr den Blutmonozyten und können zu Makrophagen und DCs differenzieren<sup>10</sup>. Die Kombination von CD14 und CD16 auf HLA-DR<sup>+</sup>-Zellen ermöglicht die Klassifizierung von drei Monozyten-Untergruppen im humanen System: klassische CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten, die circa 80–90% der Monozyten ausmachen, die proinflammatorischen CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten mit circa 2-5% und die restlichen 2-10% der patrollierenden (nicht-klassischen) CD14<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten.

Ein entscheidender Durchbruch um murine Monozyten genauer zu charakterisieren war die Erzeugung eines Reporter-Mausstamms. Hierfür wurde ein grün-fluoreszierendes (GFP)-Reporterprotein in den Cx<sub>3</sub>Cr1-Locus eingebaut. Dabei handelt es sich um einen C-X3-C Chemokinrezeptor 1, welcher von Monozyten exprimiert wird und eine wichtige Rolle für das Überleben von Monozyten darstellt. Dies erlaubt das Verfolgen von CD11b<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup> monozytären-Untergruppen in der Peripherie. Bei Mäusen sind "klassische" oder inflammatorische Monozyten durch die folgenden Merkmale gekennzeichnet: Ly6C<sup>high</sup>CX<sub>3</sub>CR1<sup>int</sup>CCR2<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD43<sup>low</sup>, wohingegen „nicht-klassische“ oder patrollierende Monozyten als Ly6C<sup>low</sup>CX<sub>3</sub>CR1<sup>high</sup>CCR2<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>CD43<sup>+</sup> definiert sind<sup>3</sup>. Interessanterweise weisen die patrollierenden Ly6C<sup>low</sup>CD14<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten sowohl im humanen und murinen System eine hohe Heterogenität auf<sup>11,12</sup>. Murine Ly6C<sup>int</sup> Monozyten gliedern sich in zwei Subpopulationen: eine davon ist gekennzeichnet durch CD209α (DC-SIGN) und MHCII-Expression, während die andere als „wahre“ Zwischenstufe von Ly6C<sup>high</sup> zu Ly6C<sup>low</sup> Monozyten aufgrund ihrer transkriptionellen Signatur bezeichnet wird<sup>11</sup>. Es wird vermutet, dass CD209a<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>Ly6C<sup>int</sup> Monozyten unter zytokinvermittelten Umständen zu monozytären DCs differenzieren<sup>13</sup>.

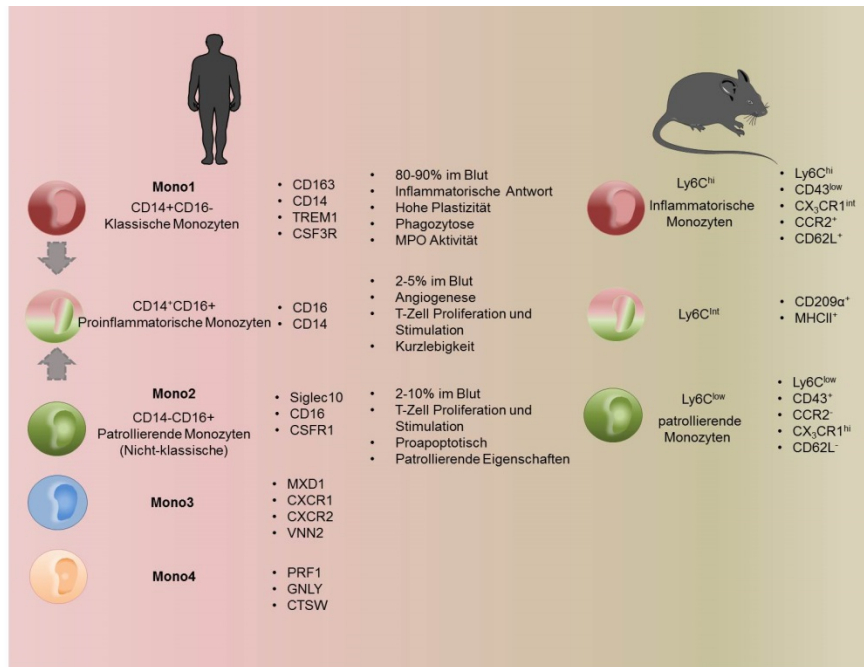


Abbildung 1: Humane und Maus Monozyten im Überblick.

Direkter Vergleich vom humanen und murinen Monozyten. Monozyten werden in Subklassen unterteilt. Im humanen System in klassische CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten, proinflammatorische CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten und patrolierende (nicht- klassische) CD14<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten. Verglichen werden hier im murinen System die inflammatorischen Ly6C<sup>high</sup>, Ly6C<sup>int</sup> und patrolierenden Ly6C<sup>low</sup> Monozyten. Im humanen System wurden zudem noch zwei weitere Monozytenpopulationen Mono3 und Mono4 beschrieben. (TREM1: *Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cells 1*, CSF3R: *Colony Stimulating Factor 3 Receptor*, CSF1R: *Colony Stimulating Factor 1 Receptor*, MXD1: *MAX Dimerization Protein 1*, CXCR1: *C-X-C Motif Chemokine Receptor 1*, CXCR2: *C-X-C Motif Chemokine Receptor 2*, VNN2: *Vanin 2*, PRF1: *Perforin 1*, GNLY: *Granulysin*, CTSW: *Cathepsin W*

14–16

Inflammatorische Ly6C<sup>high</sup> Monozyten sind in der Lage unter homöostatischen Bedingungen aus dem Knochenmark in die Blutbahn zu migrieren. 99% der Ly6C<sup>high</sup> Zellen verlassen die Zirkulation oder sterben, wobei die restlichen 1% Ly6C verlieren und als nicht klassische Monozyten unter Umständen ins Gewebe wandern oder an den Endothellzellen des Gefäßsystems sitzen, um von dort effizient Mikropartikel abzufangen<sup>17,18</sup>. Ly6C<sup>high</sup> Monozyten haben eine Lebensspanne von einem Tag, wohingegen nicht-klassische Monozyten eine Lebensspanne von 2 Tagen in der Maus und bis zu 7 Tagen im Menschen besitzen. Die Rekrutierung von Monozyten zu entzündeten Geweben resultiert nicht immer in einem Anstieg der Makrophagen- und DC-Zahlen. Stattdessen erfüllen diese infiltrierenden Monozyten häufig Funktionen, die nicht von residenten Makrophagen oder klassische DCs durchgeführt werden können. Somit erhalten Monozyten unterschiedliche Funktionsprofile und es entstehen unterschiedliche Effektorzellen, wie entzündliche, regulatorische, anti-inflammatorische oder residente Makrophagenprofile<sup>3</sup>.

### 1.1.3 Makrophagen

Makrophagen bilden eine große Familie von in Gewebe befindlichen professionellen phagozytären Zellen, einschließlich Gehirn-Mikroglia, Leber-Kupffer-Zellen, Lungen-Alveolar-Makrophagen und epidermale Langerhans-Zellen. Diese spielen nicht nur eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Krankheitserregern, sondern auch bei der Entwicklung des Gewebes und Homöostase. Im Gegensatz zu der lang gehegten Ansicht, dass zirkulierende Monozyten ihre primäre Quelle darstellen, stammen gewebsresidente Makrophagen von embryonalen Vorläuferzellen ab und entstehen unter homöostatischen Bedingungen durch Selbsterneuerung/Proliferation residenter Populationen<sup>19</sup>. Unter entzündlichen Bedingungen infiltrieren Monozyten betroffenes Gewebe und passen sich der Mikroumgebung und ihren Stimuli an, z.B. IL-4, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und differenzieren so zu Makrophagen oder DCs<sup>20</sup>. Makrophagen fungieren untergeordnet als Antigen-präsentierende Zellen und interagieren somit mit B- und T-Zellen, sind aber, anders als DCs, nicht in der Lage, naive T-Zellen zu aktivieren. Die Mustererkennung geschieht über konservierte Mannose – und Glukan - Rezeptoren (cluster of differentiation (CD206), Lipopolysaccharid- (LPS) Rezeptoren (CD14), Toll-like-Rezeptoren (TLR) und Scavenger-Rezeptoren (CD163, CD204). Ruhende Makrophagen besitzen auf ihrer Oberfläche kaum MHC-Klasse-II Moleküle. Wenn sie jedoch Mikroorganismen aufnehmen und deren fremde Molekülmuster erkennen, erhöht sich die Anzahl der MHC-Klasse-II Moleküle auf der Zelloberfläche der Makrophagen<sup>21</sup>. Des Weiteren sind Makrophagen in der Lage, ein weites Spektrum von löslichen Faktoren, beispielsweise pro- und anti-inflammatorische Zytokine, sowie Chemokine und Wachstumsfaktoren zu sekretieren. Phagozytieren Makrophagen Pathogene, werden diese in Endosomen und Lysosomen aufgenommen und abgebaut. So entstehen Peptide, die von MHC-Klasse-II Molekülen präsentiert werden können<sup>21</sup>. Makrophagen zeigen aufgrund ihres monozytären Ursprungs eine bemerkenswerte Plastizität und können auf Veränderungen der Umgebung ihre Physiologie verändern. Im entzündlichem Milieu produzieren residente Makrophagen Zytokine, Chemokine, Mediatoren wie Prostaglandine, Leukotriene und Thrombozytenaktivierungsfaktoren. Ändert sich das Milieu gehen die residenten Makrophagen in Apoptose und es öffnen sich Nischen im Gewebe<sup>22</sup>. Im Gewebe befinden sich residente Makrophagen, die sich für unbestimmte Zeit in Nischen aufhalten können, wodurch das Milieu im Gleichgewicht gehalten wird. Kommt es zu einer Entzündung können Monozyten ins Gewebe einwandern und zu entzündlichen Makrophagen differenzieren. Ist die Entzündung behoben, kehren die Zellen in die Nischen in ihren Ruhezustand zurück und entzündliche Makrophagen sterben, da sie nicht die Fähigkeit besitzen, sich selbst zu erhalten<sup>23</sup>. Die Fähigkeit von residenten Makrophagen die Nischen durch „*self-renewal*“ wieder aufzufüllen, beruht auf Genen wie *Myc*, *Klf2*, *Klf4*<sup>24</sup>. Da es sich bei Makrophagen um eine sehr heterogene Immunzellpopulation handelt, gibt es unterschiedliche Stadien während einer

Entzündungsreaktion. Sogenannte klassisch-aktivierte Makrophagen sind entscheidende Komponenten der Abwehr von intrazellulären Mikroorganismen und Infektionen. Über das angeborene Immunsystem und auch über das adaptive System, besonders über die Killerzellen, die Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) produzieren und über Tumor-Nekrose Faktor (TNF- $\alpha$ ), differenzieren gewebständige Makrophagen zu klassisch-aktivierten Makrophagen. Diese Makrophagen sekretieren pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-23, die entscheidend sind bei der Abwehr von Krankheitserregern. Die Aktivierung der klassisch-aktivierten Makrophagen muss mittels verminderte Zytokinsekretion von Fibroblasten kontrolliert werden, da sonst Zytokine und Mediatoren unkontrollierte Gewebeschäden herbeiführen können<sup>7</sup>. Ändert sich das Mikromileu der Makrophagen können sie sich auch in alternativ-aktivierte Makrophagen (M2) oder auch in sogenannte „Wundheilungs-spezifische“-Makrophagen differenzieren. Dabei handelt es sich um eine sehr heterogene Population, von der bisher mindestens drei Hauptpopulationen *in vitro* beschrieben wurden: M2a (IL-4, IL-13 aktiviert), M2b (Immunkomplex und LPS aktiviert) und M2c (IL-10 und TGF- $\beta$  aktiviert). Es fehlt jedoch ein experimenteller Beweis, dass diese *in vitro* charakterisierten Subpopulationen von Zellen *in vivo* bestimmte Rollen aufweisen. Die *in vivo*-Charakterisierung dieser Untergruppen ist schwierig und hängt vom Zeitfenster der Analyse und der Verfügbarkeit des analysierten Gewebes ab<sup>25</sup>.

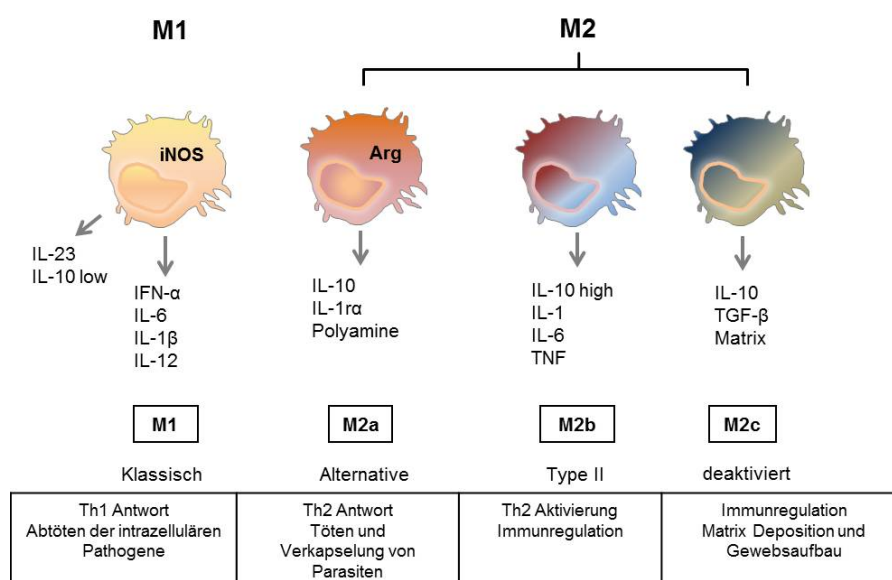


Abbildung 2: Differenzierung und Eigenschaften von Makrophagen.

Klassisch-aktivierte Makrophagen (M1) differenzieren unter dem Einfluss von Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und TNF- $\alpha$ . Alternativ-aktivierte oder „Wundheilungs-spezifische“ Makrophagen (M2) lassen sich in drei Untergruppen einteilen: M2a (IL-4, IL-13 aktiviert), M2b (Immunkomplex und LPS aktiviert) und M2c (IL-10 und TGF- $\beta$  aktiviert). IL: Interleukin; TNF: Tumor Nekrose Faktor; TGF: *Transforming Growth Factor*<sup>25</sup>

#### 1.1.4 Dendritische Zellen

DCs bilden eine heterogene Gruppe Antigen-sensibler und -präsentierender Zellen, die für die Induktion und Regulation von Immunantworten von entscheidender Bedeutung sind und daher potenzielle Ziele für therapeutische Interventionen darstellen. Sie besitzen die wichtige Fähigkeit, Antigen-spezifisch naive T-Zellen und auch NK-Zellen zu aktivieren<sup>26</sup>. DCs entwickeln sich im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen (HSC). HSC differenzieren über mehrere Intermediate in die Makrophagen-Monozyten-Dendritischen-Zell-Vorläufer (MMDP). MMDP sind durch die Expression von FLT3 (*fms like tyrosine kinase 3*), CSF-1R (*Colony stimulating factor 1 receptor*) und hohen Konzentrationen von c-Kit (CD117, Stammzellwachstumsfaktor-Rezeptor) gekennzeichnet. MMDP differenzieren zu dendritischen Zellvorläufern (CDP), die ausschließlich zu DCs werden. Innerhalb des CDP-Kompartiments können zwei Populationen durch CSF-1R-Expression unterschieden werden: eine, die bevorzugt zu plasmazytoiden pDC (CSF-1R<sup>-</sup>) und eine zweite, die sich hauptsächlich zu konventionellen cDC (CSF-1R<sup>+</sup>) differenziert. Diese Zellen verlassen mit der Expression von CD11c und ZBTB46 (*Zinc Finger And BTB Domain Containing 46*) das Knochenmark und wandern in das Gewebe ein (immature oder unreife DCs)<sup>27</sup>. Auf ihrer Oberfläche exprimieren sie neben MHC-Klasse-I/II Molekülen verschiedene kostimulatorische Moleküle der B7-Familie, vor allem CD80/CD86. Dadurch sind sie in der Lage, MHC-Klasse-I/II abhängige Peptide naiven T-Zellen optimal zu präsentieren. Im proinflammatorischen Milieu (z.B. IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) und durch Aktivierung von PRR (Mustererkennungsrezeptoren=*pattern recognition receptors*)-Liganden können sich reife aktivierte DCs entwickeln. Durch diese Gefahrensignale, oder auch durch nekrotische Zellen oder Pathogene können unreife DCs zu reifen DCs differenzieren. Nun sind sie in der Lage, T- und B-Zellen effektiv zu stimulieren<sup>28</sup>.

#### 1.1.5 Periphere regulatorische T-Zellen

Im Allgemeinen können T-Lymphozyten auf der Grundlage des von ihnen erkannten MHC-Moleküls in zwei verschiedene Typen eingeteilt werden: CD8<sup>+</sup>-zytotoxische T-Zellen, die im Kontext der MHC-Klasse I Antigene identifizieren, und CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen, die MHC-Klasse II Antigene erkennen. Neben Effektor-T-Helferzellen können CD4<sup>+</sup>-T-Zellen auch zu regulatorischen T-Zellen (Tregs) differenzieren. Ihre Differenzierung erfolgt entweder im Thymus (nTregs) oder in der Peripherie (pTregs)<sup>29</sup>. Tregs tragen zur Aufrechterhaltung der Immunhomöostase bei, indem sie die Immunantwort auf z.B. Selbstantigene, kommensalen Bakterien oder aufgenommene Nahrungsmittelantigene begrenzen. Treg-Zellen werden durch den Transkriptionsfaktor Foxp3 (*forkhead box P3*) reguliert und machen etwa 5–10% periphere CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei Menschen und Mäusen aus. Im Maussystem werden Tregs als CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen charakterisiert. Im Menschen existieren unterschiedliche Populationen regulatorischer T-Zellen, im Gegensatz zum Maussystem ist ihre Definition und

Einteilung aufgrund z.T. fehlender Marker schwierig. Annäherungsweise werden Tregs durch eine konstitutive Expression von Foxp3, einer hohen Expression der IL-2 Rezeptor  $\alpha$ -Kette (CD25) und geringe Level der IL-7R- $\alpha$ -Kette (CD127), gekennzeichnet<sup>30</sup>. Jedoch werden diese Marker auch von aktivierten T-Zellen exprimiert. Des Weiteren weisen naive Tregs (nTregs) aus dem Thymus eine geringe Expression von Foxp3 auf, dies erschwert die Charakterisierung von Tregs<sup>31</sup>. Tregs werden verschiedene Mechanismen zugeschrieben, die autoreaktive T-Zellen unterdrücken oder auf antigenpräsentierende Zellen (APZ) abzielen. Die verschiedenen Mechanismen lassen sich in Kategorien einordnen: suppressive Eigenschaft über die Sekretion von IL-10, IL-35 und TGF- $\beta$ , die Stoffwechselstörung über cAMP (Cyclisches Adenosinmonophosphat), CD39, CD73, die Modulation von APZs in ihrer Funktion und Differenzierung und die Suppression bei der Zytolyse<sup>32</sup>. Ein herausragender Mechanismus ist die Sekretion von IL-10, IL-35 und TGF- $\beta$ , die entzündliche Antworten unterdrücken. Tregs fördern unter anderem auch die Hemmung der Kostimulation mit Hilfe von CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4*). Des Weiteren regulieren sie tolerogene Moleküle, verbrauchen Interleukin 2 (IL-2) und können durch Sekretion von Granzyme A und Perforin Zielzellen töten. Nur Foxp3<sup>+</sup> Tregs mit erhöhten intrazellulären cAMP Leveln sind suppressiv<sup>33</sup>.

### 1.1.6 Myeloide Zellrekrutierung

Monozyten zirkulieren durch die Blutbahn. Tritt eine Entzündung auf wandern Monozyten durch bestimmte Stimuli ins entzündete Gewebe ein. Die Rekrutierung unter verschiedenen Entzündungszuständen ist überwiegend abhängig von CCR2. CCR2 (*C-C chemokine receptor type 2*) ist ein Chemokinrezeptor, an den CCL2 (CC-Chemokin ligand 2) und CCL7 (CC-Chemokin ligand 7, auch bezeichnet als Monozyten-chemotaktisches Protein 3 (MCP3)) binden können, um die Mobilisierung von Monozyten aus dem Knochen in den Blutkreislauf sowie die Blut-Monozyten-Homöostase aufrechtzuerhalten.

Inflammatorische Ly6C<sup>high</sup> Monozyten können über CCR2/CCL2 Interaktion aus dem Knochenmark in die Blutbahn gelangen, wo sie dort unterschiedliche Möglichkeiten haben. Sie können wieder ins Knochenmark zurückwandern, um das Gleichgewicht von Ly6C<sup>high</sup> und Ly6C<sup>low</sup> Monozyten zugunsten der patrollierenden Monozyten zu gewährleisten. Ly6C<sup>high</sup> Monozyten differenzieren unter dem Einfluss von Nr4a1, einem Transkriptionsfaktor, zu Ly6C<sup>low</sup> Monozyten. Es ist bekannt das Nr4a1 (Orphan-Nuklear-Rezeptor, aus der Subfamilie 4 Gruppe A, Mitglied 1) für die Generierung und Erhaltung der Monozyten im Knochenmark entscheidend ist. Erfolgt keine Differenzierung der Ly6C<sup>high</sup> in Ly6C<sup>low</sup> Zellen, verlassen Ly6C<sup>hi</sup> Zellen die Zirkulation oder sterben<sup>3,17</sup>. Nachdem Monozyten im *steady state* das Endothel durchquert haben, behalten sie im allgemeinen ihr vorhandenes Transkriptionsprofil (z.B.

*PU.1, IRF8, KLF4, Fli-1*) und zeigen jedoch auch einige bemerkenswerte Veränderungen im Anstieg bestimmter Proteine <sup>34</sup>. Das Expressionslevel von  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), Tumornekrosefaktor (TNF), MHC-Klasse II, CD206, CD11c und CCR7 ist erhöht und Monozyten verlieren ihre Expression von Ly6C und CD62L (*L-Selectin*). Die erhöhte Expression von MHCII und CCR7 legt nahe, dass Ly6C<sup>high</sup> Monozyten das Gewebe überwachen, um den Transport von Antigenen zu den Lymphknoten zu gewährleisten. Im *steady state* können Monozyten in das nicht-lymphoide Gewebe und das lymphoide System ohne Differenzierung migrieren, in gewebsständige Makrophagen differenzieren oder in Apoptose gehen <sup>35</sup>.

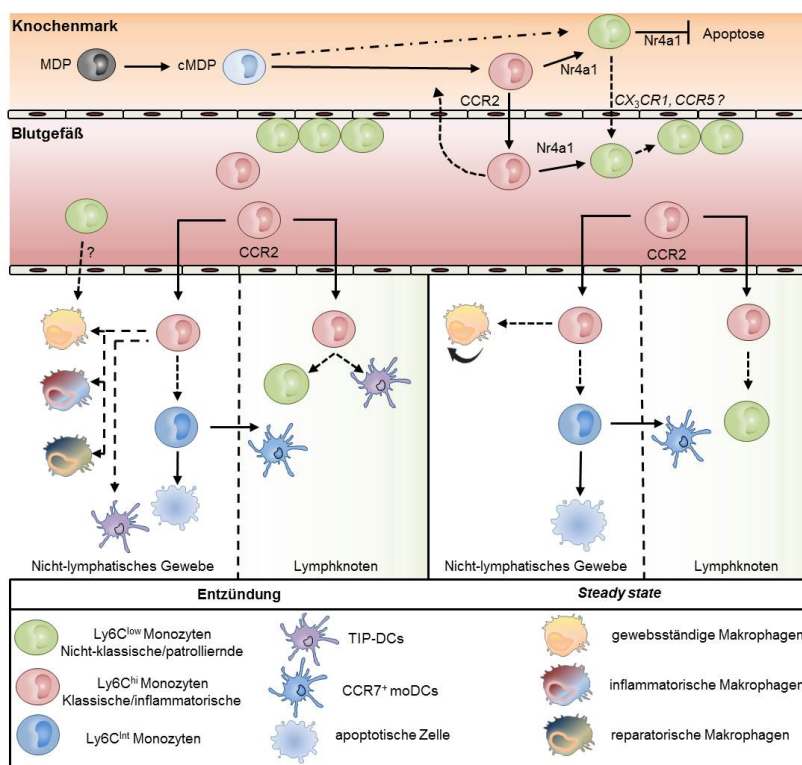


Abbildung 3: Monozytenrekrutierung im *steady state* versus inflammatorischen Bedingungen.

Monozyten entstehen im Knochenmark und werden zu Ly6C<sup>high</sup> oder Ly6C<sup>low</sup> Monozyten. Über die Expression von CCR2 wandern Ly6C<sup>high</sup> Monozyten in die Blutbahn, wohingegen Ly6C<sup>low</sup> Monozyten aufgrund der Expression von CCR5 und CX<sub>3</sub>CR1 aus dem Knochenmark diffundieren. Monozyten gelangen entweder aus dem Blut durch hoch endotheliale Venolen in die Lymphknoten (HEVs) oder aus Geweben über afferente Lymphgefäße. Monozyten unterziehen sich im nicht-lymphoiden im *steady state* drei unterschiedlichen Veränderungen: Sie können ihre monozytären Eigenschaften behalten und schließlich in Apoptose gehen, sie können CCR7 hochregulieren und zu den drainierenden Lymphknoten migrieren oder zu gewebsständigen Makrophagen differenzieren. Während einer Entzündung infiltrieren Monozyten in Gewebe und Lymphknoten, wo sie zu TNF und iNOS produzierenden DCs (TIP-DCs) differenzieren. Im nicht-lymphatischen Gewebe können Monozyten entweder gewebsständige Makrophagen nischen auffüllen oder sie differenzieren in inflammatorische oder reparatorische Makrophagen. CX<sub>3</sub>CR1, CX<sub>3</sub>C-Chemokinrezeptor 1; DC, dendritische Zelle; MERTK, MER Tyrosinkinase; CCR5: Chemokinrezeptor 5. <sup>15,36</sup>

Die Migration von Ly6C<sup>low</sup> Monozyten wird noch kontrovers diskutiert, da man vermutet, dass nicht wie bei den Ly6C<sup>high</sup> Monozyten die Migration von CCR2 abhängt, sondern von CX<sub>3</sub>CR1

und CCR5. In der Blutbahn können Ly6C<sup>low</sup> Monozyten für maximal 7 Tage an der Endothelwand entlang wandern, bis sie in Apoptose gehen oder aufgrund inflammatorischer Stimuli ins Gewebe wandern. Während einer Entzündung infiltrieren Monozyten ins Gewebe und Lymphknoten. Die Inflammation kann zu einer Differenzierung von Ly6C<sup>high</sup> Monozyten in TNF- und iNos produzierende dendritische Zellen (Tip-DCs) führen. In nicht lymphoidem Gewebe können Monozyten den Pool gewebsbeständiger Makrophagen auffüllen, allerdings nur wenn eine Nische offen ist. Außerdem können sie unter entzündlichen Bedingungen in inflammatorische Makrophagen differenzieren und somit die Entzündung weiter fördern oder als reparatorische Makrophagen an der Gewebsreparatur mitwirken. begünstigt wird dies durch das umgebene Milieu und durch M-CSF (*macrophage colonystimulating Factor*)<sup>15,35</sup>. Die Differenzierung im Gewebe ist abhängig von den Rahmenbedingungen der Gewebssituation, die durch Chemokine und Zytokine festgelegt werden.

### 1.1.7 Klassifizierung der Chemokine und das Chemokinrezeptorsystem

Chemokine sind chemotaktische Zytokine, die bei Zellen mit entsprechender Rezeptorexpression eine Wanderungsbewegung entlang eines Konzentrationsgradienten auslösen. Bei Chemokinen handelt es sich um kleine Proteine, die aus circa 75-125 Aminosäuren bestehen. Die Aminosäuresequenz ist innerhalb der Chemokinfamilie unterschiedlich konserviert. Entscheidend für die Einordnung sind die ersten beiden N-terminalen Cysteinreste, die entweder durch eine andere, nicht konservierte Aminosäure getrennt (CXC- oder  $\alpha$ -Chemokine), direkt benachbart (CC- oder  $\beta$ -Chemokine), durch drei andere, nicht konservierte Aminosäuren voneinander getrennt sein können (CX3C- oder  $\delta$ -Chemokine) oder den ersten und dritten Cysteinrest fehlt (XC-Chemokine)<sup>37</sup>.

Chemokinrezeptoren werden auf allen Leukozyten unterschiedlich exprimiert und können allgemein in zwei Gruppen eingeteilt werden: G-Protein-gekoppelte Chemokinrezeptoren (GCPR), die über Pertussistoxin (PTX) sensitive G-Proteine aktiviert werden und atypische Chemokinrezeptoren (GCPRs), an die Liganden mit hoher Affinität binden, jedoch weder Migration vermitteln noch über G-Proteine klassische Signalkaskaden aktivieren. Zu derzeitigem Stand sind 20 Signal-Chemokinrezeptoren und 5 atypische Chemokinrezeptoren bekannt<sup>38</sup>. GCPRs sind meist an heterotrimere G-Proteine gekoppelt, die aus einer  $\alpha$ -, einer  $\beta$ - und einer  $\gamma$ -Untereinheit bestehen. Die Rezeptorspezifität ist sehr komplex, da viele Chemokine an mehrere Rezeptoren binden können und einige Rezeptoren auch mehrere Liganden besitzen. Dies erschwert den spezifischen Eingriff zur Heilung bzw. Linderung von Erkrankungen<sup>39</sup>.

## 1.2 Systemische Sklerose

Die Systemische Sklerose oder systemische Sklerodermie (SSc) ist eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung, die durch eine obliterierende Angiopathie und Fibrose der Haut und innerer Organe gekennzeichnet ist. Zugrunde liegt eine Überproduktion von Kollagen, wobei hier ein Zusammenspiel von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Chemokinen und Immunzellen diskutiert wird<sup>40</sup>. Die systemische Sklerose tritt im Wesentlichen in zwei unterschiedlichen Verläufen, der limitierten und der diffusen/kutanen Form auf. Beide sind durch eine Raynaud-Symptomatik, eine anfallsweise Weißverfärbung der Finger/Zehen, bedingt durch eine Dysregulation der Gefäßfunktion im Bereich der Akren, charakterisiert. Die limitierte Verlaufsform betrifft vor allem die Haut an Händen (Ödem, Induration, Atrophie) und Gesicht (Mikrostomie, Maskengesicht). Der Verlauf der diffusen systemischen Sklerose ist progressiver und geht mit einer frühzeitigen und Prognose -bestimmenden Organbeteiligung, z.B. Motilitätsstörung des Ösophagus, fibrosierende Alveolitis/ pulmonale Hypertonie und/oder Niereninsuffizienz einher<sup>41,42</sup>. Eine ursachenorientierte Therapie der Erkrankung ist schwierig und beruht neben allgemeinen Maßnahmen der Lebensführung auf dem Einsatz von Immunmodulatoren und Immunsuppressiva, deren Effekte jedoch nur krankheitsverlangsamend sind.

### 1.2.1 Epidemiologie und klinische Pathologie

Die systemische Sklerose (SSc) tritt mit einer Prävalenz von 10-15/100000 in Europa auf. Patienten berichten retrospektiv über das Auftreten einer Raynaud-Symptomatik bereits im frühen Erwachsenenalter (2.-3. Lebensjahrzehnt)<sup>43</sup>. Zu diesem Zeitpunkt lassen sich Sklerodermie-spezifische Autoantikörper (Anti-Zentromer, Anti-Topoisomerase I (Scl70), Anti-RNA Polymerase III) nachweisen. Frauen erkranken im jungen Alter (vor dem 30. Lebensjahr) 8-mal und nach dem 60. Lebensjahr 5-mal häufiger als Männer<sup>44</sup>. Es werden einige Risikofaktoren diskutiert, die das Entstehen einer SSc begünstigen könnten. Eine Studie hat gezeigt, dass eine genetische Prädisposition (Korrelation mit HLA-B8 und HLA-DR5) wahrscheinlich mit einer Prädisposition für systemische Sklerose einhergeht<sup>45</sup>. Auch verschiedene Umweltfaktoren kommen als Auslöser für die Autoimmunerkrankung in Frage, z.B. virale Infekte, wie Zytomegalie- und Parvovirusinfektionen. Die Systemische Sklerodermie zeigt sich in einer Verdickung (Ödem) und Verhärtung (Induration) der Haut. Dieser Prozess mündet meist in einem narbigen irreversiblen Endzustand (Fibrose)<sup>43</sup>.

### 1.2.2 Fibrose

In der systemischen Sklerose ist die Fibrosierung der Haut, der Gefäßwände und innerer Organe der entscheidende pathogenzentrale Faktor, der in der unteren Dermis und oberen subkutanen Schicht auftritt und zusammen mit dem Verlust der Mikrovaskulatur und dem Aufbau an neuem Bindegewebe einhergeht. In der Frühphase der Sklerodermie ist die Ansammlung verschiedener Kollagentypen, Proteoglykane und elastische Fasern wie Fibrillin ein ausschlaggebender Faktor <sup>46</sup>. Innerhalb der systemischen Sklerose können durch verschiedene Reize, einschließlich Infektionen, Autoimmunreaktionen, Giftstoffe, Strahlung und mechanische Verletzungen Gewebeschäden verursacht werden. Der Reparaturprozess umfasst typischerweise zwei verschiedene Phasen: eine regenerative Phase, in der keine bleibenden Anzeichen von Schäden hinterlassen werden und eine als Fibroplasie oder Fibrose bekannte Phase, in der Bindegewebe durch Parenchymgewebe ersetzt wird. Der Prozess wird pathogen, wenn er nicht angemessen kontrolliert wird, was zu einer Ablagerung von ECM-Komponenten führt, bei denen normales Gewebe durch permanentes fibrotisches Gewebe ersetzt wird <sup>47</sup>.

Die Gefäßschädigung und die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies von Endothelzellen fördern die Rekrutierung von aktivierten Zellen, die Zytokine und Wachstumsfaktoren sekretieren, wodurch Fibroblasten zu Myofibroblasten differenzieren und große Mengen an Kollagen produzieren. Die dauerhafte Produktion verengt das Gewebe und die Gefäße, wodurch es zu einer Steifheit des Gewebes und unzureichender Versorgung des Gewebes kommt <sup>48</sup>.

### 1.2.3 Immunologische Mechanismen der Fibrose

Die Aktivierung und Apoptose von Endothelzellen aufgrund einer Gefäßverletzung, die durch direkte Schädigung (z.B. reaktive Sauerstoffspezies (ROS)) oder indirekt durch Anti-Endothel-Zell-Antikörper (AECA) ausgelöst werden kann, ist ein frühes Ereignis innerhalb der Sklerodermie <sup>49</sup>. Die Dysfunktion von Endothelzellen fördert die Synthese und Sekretion endogener Vasokonstriktoren (z.B. Endothelin-1). Durch die Gefäßschädigung entstehen auch Reduktionsvasodilatoren wie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin <sup>50</sup>. Dies führt zu einer Hypoxie und einer Produktion von Endothelwachstumsfaktoren (VEGF: *vascular Endothelial Growth Factor*). Die Gefäßverletzung induziert eine Ansammlung verschiedener Faktoren wie der Willebrand Faktor, lösliche Adhäsionsmoleküle, Thrombospondin, Thrombomodulin, VEGF und Plasminogen-Aktivator im Blut. Es kommt zu einer Thrombozytenaktivierung, was eine Zirkulation von Blutplättchenaggregaten zur Folge hat. Aufgrund von Endothelin-1, Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Chemokinen werden Fibroblasten aktiviert und differenzieren zu Myofibroblasten <sup>51</sup>.

Fibroblasten sind bewegliche, im Bindegewebe vorkommende Zellen, die ein Netzwerk von extrazellulären Proteinfasern und Verbindungsproteine bilden. Die Aktivierung von Fibroblasten und Myofibroblasten führt zu einer übermäßigen Ablagerung von Kollagen und extrazellulären Matrixproteinen (ECM) <sup>52</sup>. Das aktivierte Endothel sekretiert Adhäsionsmoleküle und Chemokine, was Zellen des angeborenen und später das adaptive Immunsystems anlockt. Die Gefäßschädigung veranlasst ein Einwandern aktivierter Immunzellen in die Dermis. Im entzündeten Gewebe sekretieren Neutrophile NETs und Mediatoren wie: RNS (Ribonukleinsäure) ROS, MMPS (Metalloproteasen) und MPO (Myeloperoxidase), die Monozyten adressieren. Dies veranlasst die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen und DCs. Aufgrund ihrer Umgebungsabhängigen Plastizität spielen Makrophagen in der Fibrose eine zentrale Rolle.

Während einer Entzündung werden einige Wachstumsfaktoren produziert, die Fibroblasten stimulieren und eine Gefäßneubildung einleiten. Im Zuge dieser Prozesse kann es zu einer überschießenden Aktivierung von Myofibroblasten und Fibroblasten kommen. In der Pathogenese der Fibrose werden unkontrolliert „Wundheilungs-spezifische bzw profibrotische“ Makrophagen aktiviert, die durch verschiedene Zytokine wie IL-4, IL-13 langlebig im Gewebe agieren. Diese wiederum verursachen eine Aktivierung von Myofibroblasten und eine übermäßige Synthese von extrazellulären Matrixproteinen <sup>6,7</sup>. Durch die anhaltende Sekretion von TGF- $\beta$ 1 durch Makrophagen und durch die Veränderung des Gleichgewichts von ECM-Stoffwechsel zu ECM-Ablagerung und –Ansammlung, entwickelt sich das fibrotische Gewebe

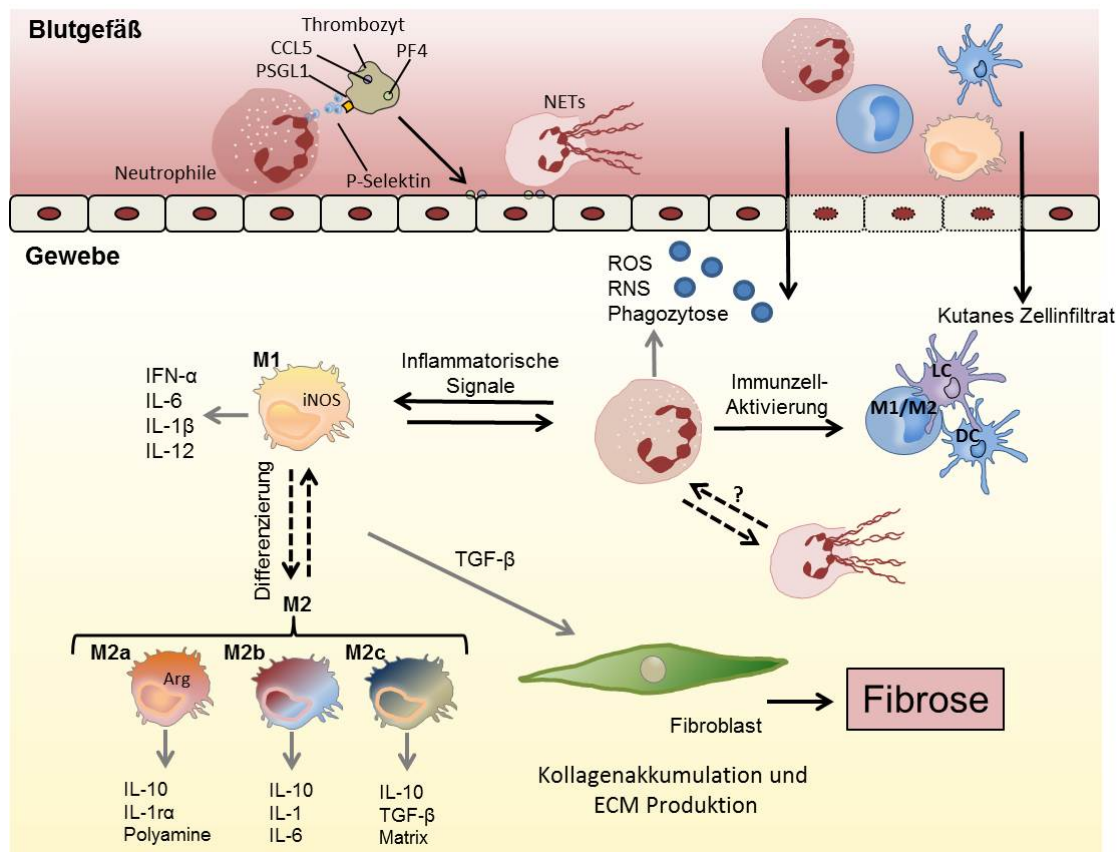


Abbildung 4: Pathogenese der Systemischen Sklerose.

Verschiedene Ereignisse können das Endothel schädigen, z. B. Autoantikörper, Toxine oder oxidativer Stress. Das geschädigte Endothel dient als Auslöser für die Thrombozytenaktivierung, was zur Bildung von Thromben und zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führt. Anschließend wandern aktivierte Immunzellen in die Dermis. Im entzündeten Gewebe ziehen von Neutrophilen abgeleitete Mediatoren und NETs Monozyten an und stimulieren die Zytokinproduktion und die ROS / RNS-Sekretion durch Makrophagen. Entzündungssignale fördern die Differenzierung in M2a (durch IL-4, IL-13), M2b (durch Immunkomplex und LPS) und M2c (durch IL-10 und TGF-β) Makrophagen. Die Sekretion von entzündlichen Zytokinen und TGF-β induziert die Synthese von extrazellulären Matrixproteinen (ECM) durch aktivierte Fibroblasten, was die fortschreitenden Fibrose der Haut bedingt. NETs: *Neutrophil extracellular traps*; DC: Dendritische Zelle; LC: Langerhans Zellen; M= Makrophage

Hat die Erkrankung den Übergang vom entzündlichen zur chronischen Phase erreicht, erfolgt ein Rückgang der mikrovaskulären Versorgung des Gewebes und eine Zunahme von regulatorischen Makrophagen und Th2-Zellen<sup>51</sup>. Es wird vermutet, dass eine Interaktion zwischen T-Zellen und DCs stattfindet und somit die Sekretion von Zytokinen begünstigt. Neben der T-Zell stimulierenden Eigenschaft können DCs die Funktion und die Aktivität von Fibroblasten, über die Sekretion von TGF-β, modulieren<sup>53</sup>. Während der Aktivierung produzieren CD4<sup>+</sup>-T-Zellen T-Helfer Zellen (Th1) Zytokine (IL-12, Interferon-γ) oder Th2 Zytokine (IL-4, IL-5 und IL-13). Obwohl viele Autoimmunerkrankungen eine Th1-polarisierte T-Zell-Antwort aufweisen, kommt es in der systemischen Sklerose zu einer vorherrschenden Th2-Polarisierung der T-Zellen<sup>51</sup>.

### 1.2.4 Experimentelle Modelle der systemischen Sklerose

Die systemische Sklerose ist eine komplexe Autoimmunerkrankung, in der das Zusammenspiel von Vaskulopathie, Fibrose, Inflammation und Autoimmunität noch unklar sind. Daher ist ein besseres Verständnis notwendig, um neue wirksame Therapien entwickeln zu können. In diesem Zusammenhang eignen sich *in vivo*-Modelle zur besseren Reflektion der Pathogenese und des Krankheitsverlaufs<sup>54</sup>. Um alle wichtigen Faktoren innerhalb der menschlichen Sklerodermie abzudecken, müssen mehrere Mausmodelle verwendet werden, da ein einzelnes Mausmodell nicht alle Aspekte der humanen Erkrankung abbilden kann.

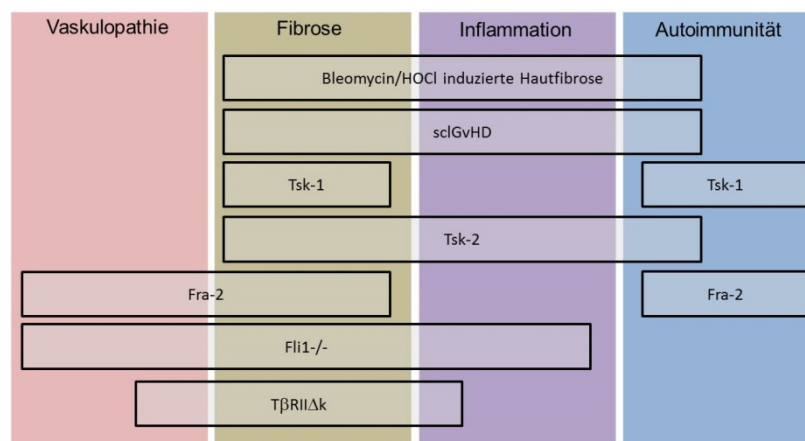


Abbildung 5: Schlüsselprozesse der Systemischen Sklerose in verschiedenen Mausmodellen.

Vaskulopathie, Fibrose, Inflammation, und Autoimmunität sind pathophysiologische Eigenschaften der human Scl. Keiner dieser Mausmodelle repräsentiert perfekt das ganze Spektrum der humanen SSc<sup>54</sup>. *Fra-2*: Fos-related antigen-2; *Fli1*: Friend leukemia integration factor-1; *Tsk1*<sup>+/+</sup>: tight skin 1; *Tsk2*<sup>+/+</sup>: tight skin 2; *TβRIIΔk*: *kinase-deficient transforming growth factor beta receptor type II*; *sclGvHD*: *Sclerodermatous Graft Versus Host Disease*

Wie in der Abbildung 5 zu erkennen, existieren einige Mausmodelle zur Untersuchung der Systemischen Sklerose. Neben den Mausmodellen mit Mutationshintergrund gibt es außerdem die Möglichkeit sklerodermieforme Prozesse in der Maus chemisch einzuleiten. In dieser Arbeit wurde mit dem chemisch induzierten Modell (Hypochlorsäure-Modell) und dem spontanen *Fra-2* Mausmodell der Sklerodermie gearbeitet.

#### 1.2.4.1 Induziertes Mausmodell: HOCl-Modell

Ein entscheidendes Ereignis in der frühen Phase der SSc Erkrankung ist die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Studien konnten zeigen, dass Haut-Fibroblasten von SSc Patienten spontan ROS produzieren können, wodurch eine Kollagenakkumulation eingeleitet wird. Die chemische Induktion der Sklerodermie erfolgt durch eine tägliche intradermale Injektion mit Hypochlorsäure (HOCl)<sup>55</sup>. In BALB/c Mäusen, bei denen es sich um einen Albinomundefizienten Inzuchtstamm handelt, konnte nach intradermaler HOCl Injektion eine Haut-

und Lungenfibrose nach sechs Wochen induziert werden<sup>56</sup>. Neben der Fibrose entwickeln sich Anti-Topoisomerase-I-Antikörper (Sci70) im Serum<sup>56</sup>. Neben der Lungenfibrose treten nach sechs Wochen HOCl-Behandlung eine Kollagenanhäufung und Gefäßschäden in der Haut auf<sup>57</sup>. HOCl-Injektionen erhöht ebenso die Anzahl von CD19<sup>+</sup>-B-Zellen, CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD8<sup>+</sup>-Zellen in der Haut und Lunge<sup>58</sup>. In der Frühphase wird durch HOCl die Stimulation der Fibroblasten induziert, die die Differenzierung in  $\alpha$ -SMA exprimierenden Myofibroblasten begünstigt. Die fibrotischen Prozesse in der Haut sind gekennzeichnet durch eine überschießende Produktion von Typ I Kollagen<sup>55</sup>.

#### 1.2.4.2 Spontanes Mausmodell: Fra-2

Das chemisch induzierte Mausmodell spiegelt nur Teilaspekte der Erkrankung wider, daher wurde als direkter Vergleich das Fra-2 (*fos-related antigen-2*) Mausmodell hinzugezogen. Die Fra-2 Linie entwickelt spontan durch eine Überexpression von Fra-2 unter dem (Haupthistokompatibilitätskomplex I) H2Kb-Promoter ab einem Alter von 9 Wochen einen sklerodermieartigen Phänotyp der Haut. Der Transkriptionsfaktor AP-1 setzt sich aus Jun (c-Jun, JunB, JunD) und Fos-Proteinen (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2) zusammen, die eine Vielzahl von Stressreaktionen kontrollieren, einschließlich Zellproliferation, Apoptose, Entzündung und Wundheilung. In den ersten Studien konnte gezeigt werden, dass das Fra-2 Modell verschiedene Merkmale der peripheren Vaskulopathie der menschlichen Erkrankung aufweisen<sup>59</sup>. In der Haut von Fra-2 Mäusen und SSc-Patienten, jedoch nicht in den Kontrollen, wurde das Fra-2 Protein vorwiegend in Gefäßstrukturen exprimiert, insbesondere in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen. Es wurde gezeigt, dass Fra-2 die Expression von Col1a1, Col1a2 und Col5a1 reguliert, die alle Hauptkomponenten von fibrotischen Läsionen bei Patienten mit SSc sind. Eine kürzlich durchgeführte Studie unterstrich die profibrotische Rolle von Fra-2 / AP-1 *in vivo* und zeigte, dass die Hemmung von AP-1 die Entwicklung im Bleomycin-induzierten Hautfibrose-Tiermodell der SSc verhinderte<sup>59</sup>. Die Fra-2 Linie entwickelt direkt nach der Geburt eine Vaskulopathie und generalisierter Entzündung die aufgrund einer progressiven Lungenfibrose, die nach circa 17 Wochen zu einem Versterben der Tiere führt. Weiterhin ist die Expression von IL-4, IL-6 und IL-2 signifikant in der Lunge von Fra-2 Tieren im Vergleich zur Wildtyp Kontrolle erhöht<sup>60</sup>. Alveolare Makrophagen (Siglec-F<sup>+</sup>CD11b<sup>low</sup>) sind in 12 Wochen alten Fra-2 Tieren verstärkt vorhanden und ihre Präsenz korreliert mit der Schwere der Erkrankung<sup>61</sup>. Bisher sind noch keine Analysen bezüglich angeborenen und adaptiven Immunzellantworten der Hautfibrose in der Fra-2 Maus bekannt.

### **1.3 Ziele der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit ist es, die funktionelle Rolle myeloider Zellen, einschließlich Monozyten, bei der Sklerodermie mit Hilfe der beiden beschriebenen Mausmodellen anhand verschiedener Parameter der Erkrankung, wie z.B. die Kollagenakkumulation und das zelluläre Infiltrat, detailliert zu charakterisieren. Der Fokus der Arbeit liegt hierbei auf den frühen entzündlichen Prozessen in der Induktionsphase, da dort potentiell mit therapeutischen Reagenzien die Immunzellantwort moduliert werden könnte. Hierfür werden zwei verschiedene Mausmodelle, das chemisch-induzierte HOCl-Modell und das spontane Fra-2 Modell, verwendet, da sie in der Summe umfassend Aspekte der humanen Erkrankung widerspiegeln. Mittels unterschiedlicher, molekularbiologischer und immunologischer Methoden werden die zelluläre Infiltration in der Haut, sowie die profibrotischen und fibrotischen Parameter beider Modelle analysiert. Außerdem wird durch unterschiedliche therapeutische Interventionsstrategien (Agonisten und blockierende Aptamere) auf Ebene der zellulären Mobilisierung versucht in den Krankheitsverlauf einzugreifen. In einer humanen Studie werden zudem monozytäre Populationen im Blut von SSc Patienten im Vergleich mit gesunden Spendern untersucht und charakterisiert, um diese humanen mit den murinen Ergebnissen zu vergleichen. Eine detaillierte Analyse der myeloiden Zellen und potentieller Intervention soll Hinweise auf mögliche neue therapeutische Zielstrukturen liefern.

## 2. Material und Methode

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Laborgeräte und Verbrauchsmaterial

| Laborgeräte / Verbrauchsmaterial | Herkunft  |
|----------------------------------|---|
| Autoklav                         | H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim (D)  |
| Waage                            | MC1, Labor LC 2200P, Sartorius, Göttingen (D)   |
| Sterilbank                       | HeraSafe, Thermo Fischer Scientific, Langenselbod (D)   |
| ELISA Microplate Reader          | Model 450, Bio-Rad Laboratories, München, (D)   |
| Durchflusszytometer              | LSRII mit Diva 6.0 von BD (Heidelberg) (D)  |
| Brutschrank                      | Hera-Cell 240i von Thermo Scientific (Bonn) (D)   |
| Vortexer                         | VV3 von VWR (Darmstadt) (D)   |
| Zentrifugen                      | Heraeus Fresco 17, Multifuge 3 L-R von ThermoScientific (Bonn), Rotina 46R von Hettich (Tuttlingen) (D)   |
| Wasserbad                        | TW12, Julabo, Seelbach, (D)   |
| pH-Meter                         | Lab 845, SI Analytics, Xylem (D)  |
| Lichtmikroskope                  | IMT2, Olympus, Hamburg, (D) DIAPLAN, Leitz,Wetzlar, (D)Axiovert 135, Zeiss, (D) Lichtmikroskop Kamera Model 3.2.0, Visitron Sytems GmbH,Software Metavue,Version 6.2r2, Universal Imaging Goup (US) |
| Magnetrührer                     | MR2002, Heidolph Elektro GmbH, Kelheim, (D)   |
| Schwenker/Schüttler              | Heidolph Polymax 2040 von Labotec (Wiesbaden)   |
| 96-Well-Mikrotitterplatte        | NUNC, Wiesbaden, (D)  |
| 96-Well-V-Bottomplatte           | NUNC, Wiesbaden, (D)  |
| Zellsieb (70µm+40 µm)            | BD Falcon, Schwerte, (D)  |
| Zentrifugen-Röhrchen (15ml/50ml) | Greiner GmbH, Frickenhausen, (D)  |
| Biopsien Puncher                 | Biopsy Punch“ Stiefel, (US)   |

|  |  |
|--|--|
| Deckgläser                             | Waldemar Knittel Glasbereitung GmbH, Braunschweig, (D) |
| Einmal-Feindosierungsspritze (1ml)     | BRAUN, Melsungen, (D)                                  |
| Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,5 ml/1ml) | Eppendorf AG, Hamburg, (D)                             |
| Kanülen (steril)                       | BD MicrolanceTM3, Heidelberg, (D)                      |
| Kanülen (steril)                       | Sterican® (21 G x 1 ½, Gr.2) Braun, Melsungen, (D)     |
| Objektträger (25 x 75 x 1mm)           | Menzel GmbH & CoKG, Braunschweig, (D)                  |
| Pipettenspitzen (10 µl/200 µl/1000 µl) | Greiner GmbH, Frickenhausen, (D)                       |
| Spülkanüle                             | Acufirm, Dreieich, (D)                                 |
| Zählkammer                             | Neubauer-Zählkammer, Merck, Wiesbaden, (D)             |
| 5ml Polystyrene Round Bottom Tube      | Falcon   |
| 1ml Insulinspritzen                    | Omnican F, Braun                                       |
| Paraffin-Einbett-Maschine              | Tissue-Tek, TEC TM, Sakura, Torrance, (US)             |
| Qiagen TissueLyser II                  | Qiagen N.V., Venlo (NLD)                               |
| Stainless Steel Beads (5mm)            | Qiagen N.V., Venlo (NLD)                               |
| Sapphire Mikroplatte, 96-well          | Greiner BIO-ONE, Kremsmünster (ÖO)                     |
| PCR Klebefolie, Ampliseal              | Greiner BIO-ONE, Kremsmünster (ÖO)                     |
| ABI 7300 Real Time PCR System          | Applied Biosystems, Waltham (US)                       |
| Thermoblock                            | Eppendorf, Hamburg (D)                                 |
| VWR Thermozykler                       | VWR, Software Version 2.3.0.0, Radnor (US)             |
| Nanodrop 2000                          | Thermofisher Scientific, Waltham (US)                  |

### 2.1.2. Chemikalien/Medikamente/Enzyme

| Chemikalien/ Medikamente/ Enzyme | Herkunft  |
|----------------------------------|---|
| Aqua dest.                       | Apotheke des Klinikums der Universitätsmedizin Mainz, (D) |

|   |   |
|---|---|
| BSA   | Bovine Serum Albumin Carl Roth GmbH, Karlsruhe, (D)   |
| EDTA  | Merck, Darmstadt, (D)   |
| Ethanol (70 %/100 %)                        | Brüggemann Alcohol, Heilbronn, (D)  |
| FCS   | Foetal Bovine Serum Gold, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich (zur Inaktivierung der Formaldehydlösung Roti-Histofix (4,5 %)<br>Carl Roth GmbH, Karlsruhe,(D) |
| Ficoll                                      | Lymphozyt Separation Medium, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich  |
| RPMI  | Lonza, Belgien  |
| DMEM  | Gibco, Life Technologies, Carlsbad (US)   |
| Trypanblau                                  | Sigma Alderich, Taufkirchen, (D)  |
| KCl   | Merck, Darmstadt, (D)   |
| MgCl <sub>2</sub> x 6xH <sub>2</sub> O      | Merck, Darmstadt, (D)   |
| CaCl <sub>2</sub> x 2xH <sub>2</sub> O      | Merck, Darmstadt, (D)   |
| Kollagenase IV                              | Worthington Biochemical Corporation, (US)   |
| Kollagenase A                               | Worthington Biochemical Corporation, (US)   |
| DNase I                                     | Sigma-Alderich Merck, Darmstadt, (D)  |
| Dispase                                     | Sigma-Alderich Merck, Darmstadt, (D)  |
| Heparin-Natrium                             | Ratiopharm, Ulm (D)   |
| UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water | Thermofisher Scientific, Waltham (US)   |
| ACK Lysing Buffer                           | Lonza (Cambrex BioScience)  |
| Roti Histofix                               | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, (D)  |
| Ethanol                                     | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, (D)  |
| Forene                                      | Abbvie, Ludwigshafen am Rhein (D)   |
| 1-Propanol                                  | AppliChem GmbH, Darmstadt (D)   |
| Eosin                                       | Sigma Aldrich, Taufkirchen, (D)   |
| Hematoxylin                                 | Sigma Aldrich, Taufkirchen, (D)   |
| Xyol  | Baack, Schwerin, (D)  |
| Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin             | Berger – meditec, Neu-Isenburg (D)  |

|                                |                                   |
|--------------------------------|-----------------------------------|
| Molybdätdiphosphorsäure-Orange | Robert Kind GmbH, Lichtenfels (D) |
| Anilinblau                     | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, (D)    |

### 2.1.3. Antikörper

#### 2.1.3.1. Durchflusszytometrie

FACS Antikörper

| Antikörper                      | Markierung       | Verdünnung | Firma                            | Bedeutung   |
|---------------------------------|------------------|------------|----------------------------------|---|
| <b>Anti-Maus CD45</b>           | FITC             | 1:50       | eBioscience, San Diego,          | Hämatopoetische Zellen                                |
| <b>Anti-Maus CD45</b>           | BV650            | 1:200      | Biologend                        | Hämatopoetische Zellen                                |
| <b>Anti-Maus CD45</b>           | BV510            | 1:500      | Biologend                        | Hämatopoetische Zellen                                |
| <b>Anti-Maus TCR beta chain</b> | BV711            | 1:400      | Biologend                        | allgemeiner T-Zellmarker                              |
| <b>Anti-Maus CD4</b>            | PerCP-Cy5.5      | 1:600      | eBioscience, San Diego           | T-Helferzellen  |
| <b>Anti-Maus CD25</b>           | Super Bright 647 | 1:25       | ThermoFisher                     | synonym IL2R $\alpha$ , aktivierte T-Zellen und Tregs |
| <b>Anti-Maus Foxp3</b>          | Pe               | 1:100      | ThermoFisher                     | aktivierte T-Zellen und Tregs                         |
| <b>Anti-Maus CD335</b>          | BV711            | 1:50       | Biologend                        | natürliche Killerzellen                               |
| <b>Anti-Maus CD19</b>           | BV711            | 1:800      | Biologend                        | B-Zellen  |
| <b>Anti-Maus Ly6C</b>           | PerCP-Cy5.5      | 1:100      | Biologend                        | myeloider Marker                                      |
| <b>Anti-Maus CD64</b>           | PeCy7            | 1:400      | Biologend                        | Monozyten, Makrophagen, DCs                           |
| <b>Zombie Nir</b>               | APCCy7           | 1:1000     | Biologend, Fixable Viability Kit | Lebend/Tot Farbstoff                                  |
| <b>Anti-Maus CD11b</b>          | BV650            | 1:800      | Biologend                        | myeloider Marker                                      |
| <b>Anti-Maus CD11b</b>          | BV510            | 1:400      | Biologend                        | myeloider Marker                                      |

|  |           |       |                        |  |
|--|-----------|-------|------------------------|--|
| <b>Anti-Maus MHC class II (I-A/I-E)</b>  | efluor450 | 1:800 | eBioscience, San Diego | Antigenpräsentierende Zellen   |
| <b>Anti-Maus CD206</b>                   | APC       | 1:50  | Biolegend              | Mannose Rezeptor; Makrophagen, DCs   |
| <b>Anti-Maus TNF-<math>\alpha</math></b> | BV510     | 1:20  | Biolegend              | Tumornekrosefaktor   |
| <b>Anti-Maus CD115</b>                   | Pe        | 1:50  | Biolegend              | <i>Colony stimulating factor 1 receptor</i> (CSF1R), Monozyten-Vorläuferzellen |
| <b>Anti-Maus CD43</b>                    | BV650     | 1:250 | BD OptiBuild           | Leukosialin, Zelladhäsionsmolekül  |
| <b>Anti-Maus CCR2</b>                    | Pe        | 1:50  | Biolegend              | Chemokinrezeptor 2   |

| Antikörper                                      | Markierung   | Verdünnung | Firma         | Bedeutung   |
|---|--------------|------------|---------------|---|
| <b>Anti-human CD19</b>                          | APC          | 1:20       | BD Bioscience | B-Zellen  |
| <b>Anti-human TCR <math>\alpha/\beta</math></b> | APC          | 1:20       | BioLegend     | allgemeiner T-Zellmarker  |
| <b>Anti-human CD56</b>                          | APC          | 1:10       | BD Bioscience | Zelladhäsionsmolekül (NCAM1); NK-Zellen                             |
| <b>Anti-human CD14</b>                          | Pacific Blue | 1:10       | Biolegend     | Glykoprotein, Monozyten, Makrophagen                                |
| <b>Anti-human CD16</b>                          | PE-Cy7       | 1:20       | BioLegend     | Fc $\gamma$ RIII, Monozyten, Neutrophile                            |
| <b>Anti-human CXCR1</b>                         | FITC         | 1:10       | BioLegend     | CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 1, Interleukin-8-Rezeptor alpha (IL-8RA) |
| <b>Anti-human CXCR2</b>                         | FITC         | 1:05       | BioLegend     | CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 2, Interleukin-8-Rezeptor beta (IL-8RB)  |
| <b>Anti-human Siglec-10</b>                     | BV711        | 1:20       | BD Bioscience | Sialinsäure-bindendes Ig-ähnliches Lectin 10                        |
| <b>Anti-human HLA-DR</b>                        | BV650        | 1:08       | Biolegend     | MHC-Klasse-II-Zelloberflächenrezeptor                               |
| <b>Anti-human CD163</b>                         | BV510        | 1:10       | Biolegend     | Scavenger-Rezeptor, Monozyten, Makrophagen                          |

|                              |             |      |               |                       |
|------------------------------|-------------|------|---------------|-----------------------|
| <b>Anti-human Granulysin</b> | Pe          | 1:02 | Biologend     | Zytolytisches Zytokin |
| <b>7AAD</b>                  | PerCP Cy5.5 |      | BD Pharmingen | 7-Aminoactinomycin    |

### 2.1.3.2. Histologie

| Antikörper                                      | Firma               |
|---|---------------------|
| <b>α-SMA</b><br><b>Anti - rabbit polyclonal</b> | Abcam,<br>Cambridge |

### 2.1.4. Puffer und verwendete Kits

| Puffer und verwendete Kits                                       | Herstellung  |
|--|--|
| 10x PBS  | 402 g NaCl und 69 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *1 H <sub>2</sub> O<br>mittels H <sub>2</sub> Odest auf 5 L aufgefüllt pH = 6,6 |
| 1x PBS   | hergestellt aus 10 x PBS pH = 7,2  |
| Erylyse-Puffer   | ACK Lysing Buffer, Cambrex, Belgien  |
| FACS-Puffer  | 1x PBS + 5 mM EDTA + 0,5% BSA  |
| MACS-Puffer  | 1x PBS + 5 mM EDTA + 0,5% HSA  |
| Trypanblau-Lösung  | 0,04 % Trypanblau in 1x PBS  |
| HB Puffer  | BSA (10%) + EDTA 0,5 M   |
| Annexin/Apoptosis Detection Kit                                  | BD Biosciences, US   |
| iScript cDNA Synthesis Kit                                       | BIO-RAD, US  |
| SYBR Green qPCR Master Mix                                       | bimake.com, US   |
| RNeasy mini kit  | Qiagen, DE   |
| eBiosciences Foxp3 staining buffer set                           | Thermofisher Scientific, Waltham (US)  |
| eBioscience Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set | Thermofisher Scientific, Waltham (US)  |
| 7AAD   | BD Becton Dickinson, Franklin Lakes (US)   |

### 2.1.5. Depletierende Antikörper

| Antikörper           | Firma          |
|----------------------|----------------|
| Anti-Maus CD11b M170 | Bio X Cell, US |
| Isotype IgG2b        | Bio X Cell, US |
| Anti-Maus Ly6c       | Bio X Cell, US |
| Isotype IgG2a        | Bio X Cell, US |

### 2.1.6. Synthetische Oligonukleotide

Für alle Experimente wurden Oligonukleotide, die von der Firma Biomers (Ulm, Deutschland) synthetisiert und im lyophilisierten Zustand erworben wurden, mit RNA freien Wasser auf eine Konzentration von 100µM (100pmol/µl) eingestellt und als Stocklösungen bei -20°C gelagert.

| Bezeichnung   | Sequenz des Oligonukleotids (5'-3' Richtung) |
|---|--|
| <b>Hprt (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) forward</b> | CAGTCCCAGCGTCGTGATTA                         |
| <b>Hprt (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) reverse</b> | TGGCCTCCCATCTCCTTCAT                         |
| <b>B2m (beta-2 microglobulin) forward</b>                             | ACGTAACACAGTTCCACCCG                         |
| <b>B2m (beta-2 microglobulin) reverse</b>                             | CAGTCTCAGTGGGGGTGAAT                         |
| <b>CCR2 forward</b>   | ACAGCTCAGGATTAACAGGGACTTG                    |
| <b>CCR2 reverse</b>   | ACCACTTGATGCACACATGAC                        |
| <b>TNF alpha forward</b>  | GACCCTCACACTCAGATCATCTTCT                    |
| <b>TNF alpha reverse</b>  | TCCAATTGGTGGTTTGATACG                        |
| <b>CD206 forward</b>  | GGCAGGATCTTGGCAACCTAGTA                      |
| <b>CD206 reverse</b>  | GTTTGGATCGGCACACAAAGTC                       |

### 2.1.7. Versuchstiere

Es wurden weibliche Mäuse des Zuchtstammes C57BL/6J (Janiver Labs, Frankreich) im Alter von 6-9 Wochen verwendet. Sie wurden unter keimfreien Bedingungen im „Translational Animal Research Center (TARC)“ der Johannes Gutenberg-Universität Mainz gehalten.

Splenektomierte Mäuse und entsprechende Kontrolltiere wurden im Alter von 6-8 Wochen bei Jackson Laboratories (JAX, Maine USA) erworben.

Die Fra-2 Maus (*fos-related antigen 2*, erhalten von Erwin Wagner) entwickelt spontan durch eine Überexpression von Fra-2 unter dem (Haupthistokompatibilitätskomplex I) H2Kb-Promoter ab einem Alter von 9 Wochen einen sklerodermieartigen Phänotyp. Im Verlauf der Erkrankung kommt es mit ansteigendem Alter zu einer Gewebsfibrose der inneren Organe, aufgrund einer starken Lungenfibrose liegt die Lebenserwartung von Fra-2-Tieren bei 17 Wochen.

Die Herstellung dieser Maus wurde 2008 erstmals publiziert. Eferl et al. beschrieben 2008, dass das murine *fra-2* Gen zusammen mit der intraribosomalen Eintrittssequenz IRES und dem Reporter gen EGFP hinter den ubiquitären H2Kb Promotor kloniert wurde. Um die *fra-2* mRNA zu stabilisieren und eine *fra-2* Expression in den Mesenchymalenzellen zu erreichen wurde hinter die IRES-EGFP Sequenz die 3'LTR (long terminal repeat sequence) des Finkel-Biskis-Jenkins murinen Sarkomavirus eingefügt. Danach wurde das H2Kb-*fra-2*-IRES-EGFP Konstrukt durch pronukleare Injektion in das Genom von C57Bl/6 J Rj Oozyten injiziert <sup>60</sup>.

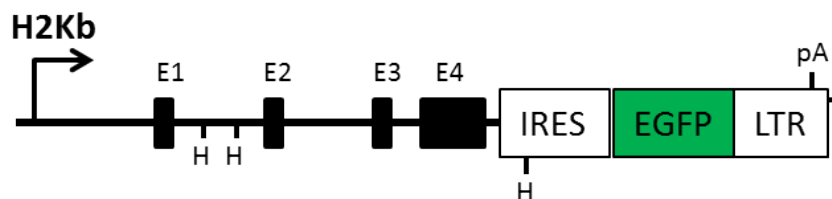


Abbildung 6: Transgenes Konstrukt zur ektopischen Expression von *fra-2*

Das Konstrukt besteht aus einem H2Kb-Promoter welcher am genomischen *fra-2* Lokus sitzt. Ebenso befindet sich dort eine Reporter-IHRES-EGFP- Sequenz und einer LTR-Sequenz, die von einem Polyadenylierungssignal (pA) und einer Restriktionsstelle HINDII (H) flankiert sind <sup>60</sup>.

Eine Genehmigung des Landesaufsichtsamts Rheinland Pfalz liegt für alle Tierversuche vor (Ref.Nr. 23 170-07/ G13-1-085; G18-1-070).

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. HOCl-induzierte dermale Fibrose

#### 2.2.1.1. Experimenteller Aufbau

Weibliche C57BL/6J Mäuse wurden am Rücken rasiert und anschließend täglich (ausgenommen an Wochenenden) intradermal HOCl (2,6% aktives Chlorid/Injektion) oder PBS als Kontrolle injiziert. Zur Vergrößerung des Areals wurde in einem Abstand von einem Zentimeter zwei Injektionen durchgeführt.



Abbildung 7: Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls.

Von Montag bis Freitag wurden die Mäuse intradermal (i.d.) am Vormittag gespritzt (schwarze Pfeile, Wochenende graue Pfeile). Nach einer, zwei und vier Wochen wurden die Organe entnommen.

Den rasierten Tieren wurden sechs Hautbiopsien ( $\varnothing$  8mm) um die Injektionsstellen entnommen. Eine Stanze wurde histologisch aufgearbeitet, wohingegen zwei Stanzen für qPCR Analysen verwendet wurden. Die hinteren drei Stanzen wurden enzymatisch verdaut und die Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS) analysiert.

### 2.2.2. Zucht und Typisierung der Fra-2-Mäuse

Die Zucht der Fra-2 - Linie erfolgt heterozygot mit Fra-2tg tragenden Böcken und C57BL/6J Weibchen im Alter von 8 Wochen. Der Austausch der transgenen Zuchtböcke erfolgt jeweils zum Eintritt der Lungenfibrose in Woche 14-16.

Um das Vorhandensein der Transgen-Kassette der Nachkommen zu verifizieren, wurden den Tieren nach dem Absetzen (3 Wochen) Blut aus der Fazialvene entnommen und durchflusszytometrisch die GFP Expression bestimmt.

### 2.2.3. Organentnahmen

#### 2.2.3.1. Gewinnung und enzymatische Aufarbeitung der Hautstanzen

Um Hautstanzen zu gewinnen wurden die Tiere ordnungsgemäß euthanasiert und gründlich rasiert. Mit einer stumpfen Schere wurde am oberen Kopfende der Rückenhaut ein 5x2cm großes Hautstück herausgeschnitten. Mit einem Papiertuch wurden die restlichen

Fettschichten von der Dermis entfernt. Mit Hilfe einer Hautstanze wurden sechs (8 mm Durchmesser) Gewebeproben entnommen. Drei der Stanzen wurden mehrfach an der haarlosen Seite mit einem Skalpell in einer 6-well Platte angeritzt. Je nach dem welche durchflusszytometrische Färbung mit den Zellen erfolgen sollte wurden zwei unterschiedliche Verdauungen angesetzt.

Hautverdau zur Detektion myeloider Marker: Es erfolgte ein Verdau der Biopsien mit 2ml PBS und 200µl Dispase (10mg/ml) + 1µl DNase (10000U/ml) für 45 Minuten (min) bei 37°C (5% CO<sub>2</sub>) im Brutschrank. Mit 5% FCS stoppte man die Enzymreaktion ab, um danach die Hautstanzen in ein 2ml Reaktionsgefäß, gefüllt mit 300µl DMEM + 180µl FCS + 180µl KollagenaseIV (8000U/ml) + 0,9µl DNase (10000U/ml), zu überführen. Die Stanzen wurden händisch mit einer Schere in kleinste Stücke zerkleinert. Die Reaktionsgefäße wurden mit dem restlichen DMEM Medium auf 1,8ml aufgefüllt und für weitere 60 min auf einem Thermomixer bei 37°C und 600rpm inkubiert. Um die Enzymreaktion zu stoppen wurden 40µl 0,5M EDTA Lösung für weitere 10 min bei 37°C in das vorhandene DMEM Medium pipettiert. Mit HB Puffer (HBSS + 2mM EDTA + 0,5 BSA) wurden Hautstanzen über einen 40µm Zellsieb in ein 50ml Falcon gespült. Die Zellsuspension wurde nun bei 4°C bei 350xg für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand konnte nun vorsichtig abgesaugt und in die V-Boden Platte für eine FACS-Färbung überführt werden.

Hautverdau zur Detektion lymphozytärer Marker: Die Verdauung bestehend aus RPMI + 180µl FCS + 180µl Collagenase A (20mg/ml) + 0,9µl DNase (100000U/ml) wurde in ein 2ml Reaktionsgefäß mit je 300µl vorlegt. Drei Hautstanzen wurden wie zuvor im myeloiden Hautverdau mit einer sterilen Schere in kleine Stücke zerschnitten. Nach gründlicher Zerkleinerung wurden die Reaktionsgefäße auf 1,8ml mit dem restlichem Medium aufgefüllt. Die Reaktionsgefäße wurden für 90 min im Thermomixer bei 37°C inkubiert. Für 10 min wurden die Stanzen bei 37°C mit 40µl EDTA inkubiert. Wie zuvor beschrieben wurden die Hautstanzen mit HB Puffer (HBSS + 2mM EDTA + 0,5 BSA) über einen 40µm Zellsieb in ein 50ml Falcon gespült. Die Zellsuspension wurde nun bei 4°C bei 350xg für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand konnte nun vorsichtig abgesaugt und in die V-Boden Platte für eine FACS-Färbung überführt werden.

#### **2.2.3.2. Gewinnung und Aufarbeitung der axillären/zervikalen Lymphknoten**

Die zervikalen/axillären Lymphknoten wurden nach Entnahme direkt in 50ml Röhrchen, welches mit 1xPBS gefüllt ist, überführt und auf Eis gelagert.

Die zuvor entnommenen Lymphknoten wurden in ein 70µm Zellsieb gegeben, zerrieben und mit 1xfach PBS auf 50ml aufgefüllt. Anschließend wurden sie bei 4°C bei 112xg für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es erfolgte eine Erythrozytenlyse des Zellsediments mit 1ml ACK Lyse - Puffer für 3 min. Die Lyse wurde durch ein Auffüllen mit 1xPBS auf 50ml gestoppt. Die Zellen wurden gewaschen (4°C; 112xg; 10 min). Abschließend wurde der Überstand verworfen und auf 10ml mit 1xPBS aufgefüllt.

#### **2.2.3.3. Gewinnung und Aufarbeitung des Knochenmarks**

Für die Gewinnung von Knochenmarkszellen wurden die Mäuse euthanasiert und jeweils die Humera, Femora und Tibien frei präpariert. Die Knochen wurden in PBS + 1% FCS zwischen gelagert, um danach unter sterilen Bedingungen die jeweiligen Knochen mit einem frischen Skalpell in einer Petrischale zu öffnen. Mit einer 18 gauge Nadel wurden die einzelnen Knochen mit PBS + 1%FCS durchgespült und die Zelllösung in der Petrischale gesammelt. Die Zellsuspension wurde in ein 70µm Zellsieb gegeben, um kleine Knochenstücke zu entfernen und die Suspension durch das Sieb mit 1xPBS auf 50ml aufgefüllt. Anschließend wurden die Röhrchen bei 4°C bei 112xg für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es erfolgte eine Erythrozytenlyse mit 1ml ACK Lyse Puffer für 90 Sek. Nach 90Sek wurde die Lyse durch Auffüllen des Röhrchens mit 1xPBS auf 50ml gestoppt. Nach einer Abschließenden Zentrifugation (4°C; 112xg; 10 min) wurde das Zellpellet auf 5ml mit 1xPBS aufgefüllt. Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen der Knochenmarkszellen wurden pro Probe  $1 \times 10^6$  Zellen gefärbt.

#### **2.2.3.4. Blutgewinnung und Lyse**

Mit einer 4-5,5 mm Lanzette 3-4 mm dorsokaudal des Haarwirbels am Unterkiefer wurden die Tiere punktiert, um Blut zu gewinnen. Die Tropfen wurden in einem 1,5ml Reaktionsgefäß gesammelt, in welchem sich 20µl Natrium-Heparin befand. Anschließend wurde für eine Minute die Einstichstelle komprimiert, um die Blutung zu stoppen. Zum lysieren der Erythrozyten wurde das Blut mit 100µl ACK Lyse Puffer für 3 min inkubiert. Abgestoppt wird die Lyse mit 1ml 1xPBS und nachfolgender Zentrifugation (400xg 5 min, RT). Die Erythrozytenlyse wurde so lange wiederholt, bis der Überstand nach der Zentrifugation durchsichtig ist.

#### 2.2.4. Aufarbeitung Vollblut

Um periphere, mononukleäre Zellen aus heparinisertem Vollblut von Sklerodermie-Patienten und gesunden Probanden zu gewinnen, wurde eine Dichtegradientenzentrifugation, einer Polysaacharoselösung (Ficoll) der Dichte 1.077g/l, durchgeführt. 15ml Ficoll wurden in vier 50ml Röhren vorgelegt um dann je 35ml Vollblut langsam und in einen 65° Winkel auf das Ficoll zu schichten. Danach wurden die vier Röhren für 30 min bei 900xg ohne Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert. Aufgrund ihrer höheren Dichte sinken die Erythrozyten und Granulozyten durch das Ficoll nach unten, während sich über der Ficollschicht eine Interphase mit den PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*) im Plasma bilden. Mit einer Stabpipette wurden die PBMCs auf der Interphase abgenommen, in ein neues 50ml Röhren überführt und mit MACS Puffer gewaschen (Zentrifugation bei 200xg für 10 min/RT mit Bremse). Dieser Zentrifugationsschritt wurde noch zwei weitere Male wiederholt. Die letzten drei Waschschrte erfolgten bei 400xg für 10 min bei 4°C bis der Überstand im Röhren ganz klar erscheint. Das Zellpellet wurde in 15 ml MACS Puffer aufgenommen und wie in 2.2.5 beschrieben auf Viabilität und Zellzahl untersucht.

#### 2.2.5. Hämozytometrische Zellzahlbestimmung

Um die Viabilität und die Zellzahl der Suspension zu bestimmen, wurden 10µl Zellsuspension entnommen und mit 90µl Trypan Blau gemischt. 10µl wurden auf die Neubauer-Zählkammer aufgetragen und unter einem Lichtmikroskop gezählt. Blau gefärbte Zellen gelten als tote Zellen, da die Integrität der Plasmamembran zusammengebrochen ist und somit der Farbstoff eindringen konnte. Diese gefärbten Zellen wurden nicht in die Zellzahlberechnung einbezogen. Die Berechnung der Gesamtzellzahl ergab sich wie folgt:

$$\begin{aligned} \Sigma \text{Gesamtzellzahl} \\ = X (\text{Gezähltes}) \times \text{Volumen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor} (10^4) \end{aligned}$$

#### 2.2.6. Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie oder auch FACS-Analyse („Fluorescence-activated cell sorting“) handelt es sich um eine Methode mit der man physikalische und molekulare Eigenschaften von Partikeln (z.B. Zellen) in einem Flüssigkeitsstrom zählen und analysieren kann. Mittels bestimmter Moleküle auf der Oberfläche oder im Zellinneren, sowie anhand der Größe und Granularität der Zellen können unterschiedlichste Zellen quantifiziert werden. Das Zytometer misst anhand der Streuung des Lichts, hervorgerufen durch den Zelldurchfluss, zunächst die Größe der Zelle anhand der Detektion von Vorwärtsstreulicht, dem FSC (*Forward Scatter*). Als zweiter Parameter dem Seitwärtsstreulicht tritt der SSC (*Side Scatter*) auf, welcher die

Komplexität/Granularität der Zelle bestimmt. Je komplexer die Zelle ist, desto mehr Licht wird seitlich durch die entsprechenden Granula, Vesikel usw. abgeleitet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die FACS-Analyse zur quantitativen Bestimmung von oberflächlichen, intrazellulären und intranukleären Antigenen verwendet. Das in dieser Arbeit verwendete Durchflusszytometer BD LSRII verfügt über eine RBV-Konfiguration: Roter Laser 633 nm, Blauer Laser 488 nm (Argon+), Violetter Laser 405 nm.

#### **2.2.6.1. Extrazelluläre Färbung**

Für eine Markierung von Oberflächenantigenen wurden  $1 \times 10^6$  Zellen pro Röhrchen verwendet, dies galt jedoch nicht für die Hautstanzen, da sie in der Gesamtzellzahl viel weniger aufwiesen und somit komplett für die Analyse verwendet wurden. Die Zellen wurden mit FACS-Puffer gewaschen und der  $F_{cy}$ -Rezeptor wird für 5 min bei RT in der V-Bodenplatte mit CD16/CD32 mAbs geblockt. Danach erfolgte eine Inkubation mit verschiedenen Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen Oberflächenantigene. Die Zellen wurden für 15 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert, danach zwei Mal in 100 µl FACS Puffer gewaschen um sie in 150µl FACS Puffer aufzunehmen und am BD LSRII zu analysieren.

#### **2.2.6.2. Intrazelluläre Färbung**

Die intrazelluläre Färbung wurde mit dem Fixation/Permeabilisation Buffer Kit (eBioscience) durchgeführt. Nach der Oberflächenfärbung wurden die Zellen mit 100µl Cytofix (IC-Fixation Buffer) für 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 1xWash/Permeabilisierungspuffer gewaschen, um nachfolgend anti-TNF- $\alpha$ -mAb und anti-CD206-mab in 1xWash/Permeabilisierungspuffer für 60 min bei Raumtemperatur zu inkubieren. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 100µl 1xWash/Permeabilisierungspuffer gewaschen und in FACS-Puffer resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert.

#### **2.2.6.3. Intranukleäre Färbung**

Die intranukleäre Foxp3-Färbung wurde mit dem Foxp3-Detektionskit (eBioscience) durchgeführt. Nach der extrazellulären Färbung wurden die Zellen in der V-Bodenplatte mit 75µl (1×Fixierungs-/Permeabilisierungskonzentrat mit 3×Foxp3-Fixierungs-/Permeabilisierungs-Verdünnungsmittel) für 30 min bei 4 Grad inkubiert. Nach 2 Waschschritten mit 1xPermeabilisierungspuffer wurden die Zellen 30 min bei 4°C mit anti-Foxp3-mAb in 1xPermeabilisierungspuffer inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit

150µl 1xPermeabilisierungspuffer wurden die Zellen in FACS-Puffer resuspendiert und am BD LSRII analysiert.

#### 2.2.6.4. T-SNE Analyse von Durchflusszytometrischen Daten

Der t-SNE-Algorithmus (*t-distributed stochastic neighbor embedding* (tSNE)) ermöglicht eine Dimensionsreduktion eines beliebigen Datensatzes in eine 2D-Visualisierung, bei der der Abstand zwischen einzelnen Punkten die Ähnlichkeit zwischen allen analysierten Dimensionen darstellt. Je näher zwei Punkte sind, desto größer sind die jeweiligen Expressionsmuster. Der t-SNE-Algorithmus rechnet die Affinitäten von Datenpunkten in Wahrscheinlichkeiten um. Die Affinitäten im Originalraum werden durch gemeinsame gaußsche Verteilungen dargestellt und die Affinitäten im eingebetteten Raum durch studentsche t-Verteilungen. Innerhalb des Datensatzes ist es möglich, sich einzelne Marker und dessen Expression in den separaten Clustern anzeigen zu lassen<sup>62</sup>.

#### 2.2.7. Histologie

Nach der Entnahme der Hautbiopsien und Fixierung in 10% Formalin bei 4°C über Nacht wurden die Biopsien in heißes Paraffin eingebettet. Aus dem heißen Paraffin wurden die Gewebe in Blöcke gegossen und nach dem Erkalten in 0.1µm große Schnitte geschnitten. Zum Anfertigen der Schnitte wurde ein Mikrotom verwendet. Im Anschluss wurde die Schnitte mittels Mason-Goldners Trichrom (GT) gefärbt, um die Inflammation und die Hautdicke zu beurteilen. Für die Anfertigung der Mason-Goldner Färbung wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert, um sie dann in absteigender Ethanol Konzentration (99,9% Ethanol-80% Ethanol) zu rehydrieren. Die Färbungsschritte liefen wie folgt: Hämatoxylin nach Weigert (4 min), fließendes Leitungswasser (10 min), Säurefuchsin-Ponceau-Xylidine (3 min), 1% Essigsäure (kurz), Phosphorwolframsäure-Orange G (5 min), 1 % Essigsäure (kurz), Lichtgrün (15 min), 1% Essigsäure (2 min). Danach folgte eine Dehydrierung mit Ethanol und eine Fixierung mit Roticlear. Schnitte wurden mit dem Olympus BX61 Mikroskop angeschaut und die Dicke die Dermis konnte in einem definierten Bereich mit einer Distanzlinie berechnet werden (pro Schnitt fünf Distanzlinien). Immunhistologische Analysen mittels Antikörper gegen α-SMA (rabbit polyclonal; abcam; 1:300) wurden von eingebetteten Hautschnitten in Paraffin angefertigt. Schnitte wurden über Nacht mit dem Erstantikörper bei 4°C inkubiert und danach mit PBS gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper für eine Stunde (α-SMA: Histofine universal alkalische Phosphatase polymer, Vector). Danach wurde erneut mit PBS gewaschen. Zum Schluss wurden die Schnitte mit der alkalischen Phosphatase (α-SMA; AP -Vectastain) für 15 min inkubiert. Schnitte wurden mit dem Olympus

BX61 Mikroskop analysiert und positive Zellen wurden gezählt (im Vergleich zur Isotypkontrolle).

### **2.2.8. Quantitative RealTime Polymerasekettenreaktion**

Die quantitative Echtzeit-PCR oder *real-time quantitative PCR* (qPCR) beruht auf einer Polymerasekettenreaktion, welche im Jahre 1986 von Kary B. Mullis zum ersten Mal beschrieben wurde. Dabei handelt es sich um eine Vervielfältigungsmethode von Nukleinsäuren, die zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Die Quantifizierung erfolgt mittels Fluoreszenz-Messungen, die während eines PCR-Zyklus in Echtzeit erfasst werden. Während den Zyklen nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Nach Beendigung aller Zyklen erfolgt die Quantifizierung der erhaltenen Fluoreszenzsignale in der exponentiellen Phase der PCR.

#### **2.2.8.1. RNA Isolation**

Für die Isolation von RNA (Ribonukleinsäure) aus Ø8mm Stanzen wurde das QIAmp RNA mini Kit (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Um die RNA aus der Haut freizusetzen, wurden sie mit einer Metallkugel und 600µl RLT +1% beta-Mercaptoethanol im Tissue Lyser II (Qiagen) für insgesamt 4 min bei 30Hz zerkleinert. Um eine Kontamination mit genomischer DNA zu verhindern wurde auf der gDNA-Isolationssäule gemäß den Herstellervorgaben ein DNaseI Verdau durchgeführt. Die isolierte RNA wurde in 40µl RNA-freiem Wasser bei -80°C gelagert.

#### **2.2.8.2. cDNA- Synthese**

Da nur DNA, nicht aber RNA, kloniert werden kann, muss diese RNA in eine komplementäre DNA (cDNA: *complementary DNA*) umgeschrieben werden. Die Synthese von doppelsträngiger cDNA wird von dem viralen Enzym reverse Transkriptase katalysiert. Der oligo-dT Primer bildet durch Basenpaarung mit dem poly(A)Schwanz der mRNA ein kurzes RNA-DNA-Hybrid aus. Nun kann die reverse Transkriptase das 3`Ende des Primers verlängern, wenn sie das 5`Ende erreicht hat entfernt sich die RNA. Dadurch beginnt die Synthese des nächsten Strangs.

Für die Synthese von cDNA wurde das iSCRIPT Kit verwendet. Als Ausgangsmaterial wurden 250-500ng RNA eingesetzt und sich an die weiteren Herstellerangaben gehalten.

|                                  | Volume per Reaction $\mu$ l |
|----------------------------------|-----------------------------|
| 5x iScript Reaction Mix          | 4                           |
| 5x iScript Reverse Transcriptase | 1                           |
| Nuclease-free Water              | Variable                    |
| Rna templatte (500ng)            | Variable                    |
| Total Volume                     | 20                          |

### 2.2.8.3. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Mittels der gewonnenen cDNA wurde nach Angaben des Herstellers (bimake.com) eine qPCR angesetzt. Dabei erfolgte zunächst ein Denaturierungsschritt bei 95°C, um die einzelnen DNA-Stränge zu trennen und ebenso die DNA-Polymerase zu aktivieren. Danach folgte eine Hybridisierung bei 60°C, damit die Primer an die komplementäre Sequenz der einzelsträngigen DNA binden können. Zu guter Letzt wurde bei 72°C eine optimale Arbeitstemperatur hergestellt, damit ein neuer DNA Strang entstehen kann. Dieser Prozess wird Elongation genannt. Die Verdopplung der DNA-Moleküle wurde durch den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green, der eine hohe Affinität zur doppelsträngigen DNA besitzt, gemessen.

Die Proben wurden in der 96-well Platte abzentrifugiert (350xg, 4 min, 4°C), um sie dann im Thermocycler (ABI 7300) zu platzieren. Das Cycler-Programm wurde wie folgt durchgeführt.

|             | 1                     | 2             |           | 3            |        |        |
|-------------|-----------------------|---------------|-----------|--------------|--------|--------|
| Zwei Stufen | Hot Start DNA Polymer | PCR           |           | Schmelzkurve |        |        |
|             | HOLD                  | 40 Zyklen     |           | 1 Zyklus     |        |        |
|             |                       | Denaturierung | Annaeling |              |        |        |
| Temperatur  | 95.0°C                | 95.0°C        | 60.0°C    | 95.0°C       | 60.0°C | 95.0°C |
| Zeit        | 30Sek                 | 15Sek         | 60Sek     | 15Sek        | 60Sek  | 15Sek  |

Nach dem Lauf wurde eine Schmelzkurvanalyse durchgeführt, die Amplifikation von Primerdimeren vom spezifischen qPCR-Produkt zu unterscheiden (Daten hier nicht gezeigt). Für eine quantitative Aussage über die Amplifikation des Zielgens wurden die Ct-Werte in Verhältnis zu einer spezifischen Referenzprobe (Kontrolle-Haushaltsgen) gesetzt.

Dabei wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{fold change HKG} = \frac{2^{\text{Ct Ko (HKG)}}}{2^{\text{Ct HKG}}}$$

Ct Ko (HKG) = Ct-Werte des Ansatzes mit Kontrolle (Referenzprobe)

Ct HKG = Ct-Werte des Ansatzes mit dem jeweiligen HKG

$$\text{fold change T} = \frac{2^{\text{Ct Ko (T)}}}{2^{\text{Ct T}}}$$

Ct Ko (T) = Ct-Werte des Ansatzes mit Kontrolle (Referenzprobe)

Ct T = Ct-Werte des Ansatzes mit dem target

Pro Probe und HKG (*housekeeping gene* = Haushaltsgen) wird das Verhältnis fold change target zu fold change HKG gebildet.

### 2.2.9. Statistik

Die Darstellung der Daten, sowohl statistisch wie auch graphisch, erfolgte mittels des Programms GraphPad Prism 6. Eine parametrische One-way ANOVA Analyse verbunden mit einem Post Hoc Test nach Tukey wurde zur Ermittlung statistisch signifikanter Unterschiede (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  und \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ) verwendet. Die Chorddiagramme (siehe Abb.13) wurden mit dem Statistikpaket R erstellt (*circlize package*)<sup>63,64</sup>.

### 3. Ergebnisse

Die progressive systemische Sklerodermie ist eine seltene chronische Autoimmunerkrankung, die sich in einer fibrotischen Veränderung der Haut und anderer Organe wie der Lunge, Leber und Niere äußert. Die geringe Patientenzahl, die Heterogenität und die Komplexität des Krankheitsbildes erschweren die Therapiemöglichkeiten und somit die Lebensqualität der Patienten.

Anhand von experimentellen Tiermodellen sollen die immunologischen Prozesse mit dem Fokus auf myeloide Zellen und deren Konversion während der Fibroseinduktion untersucht werden. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Mausmodelle der systemischen Sklerodermie verwendet. Die Induktion der Fibrose erfolgte hierbei chemisch durch die Applikation von Hypochlorsäure, die als reaktive Sauerstoffspezies (ROS)-Donor wirkt. Da das induzierbare Modell nur Teile der Erkrankung widerspielt, wurde ebenso ein spontanes Mausmodell der systemischen Sklerose verwendet: die *fos-related antigen 2* (Fra-2) Mauslinie. Die Fra-2 Maus entwickelt spontan aufgrund einer Überexpression von Fra-2 unter dem (Hapthistokompatibilitätskomplex I) H2Kb-Promoter einen sklerodermieformen Phänotyp ab einem Alter von 9 Wochen.

Im Rahmen dieser Arbeit soll die zelluläre Infiltration, die Kollagenakkumulation und die funktionelle Rolle von Monozyten in beiden Mausmodellen charakterisiert werden. Besonders wird der Fokus auf die Induktionsphase der Entzündungsreaktion gelegt, da dort potentiell mit therapeutischen Reagenzien die Immunzellantwort moduliert werden kann. Eine detaillierte Analyse der myeloiden Zellen und deren Interaktion mit der adaptiven Immunantwort soll Hinweise auf mögliche neue therapeutische Zielstrukturen liefern.

#### 3.1. Analyse pro-fibrotischer und fibrotischer Parameter nach Depletion im induzierten Mausmodell

In früheren Studien konnten wir zeigen, dass das Hypochlorsäure (HOCl)-induzierte Mausmodell einige relevante Aspekte der humanen systemischen Sklerose abbildet. So führt die tägliche Applikation von HOCl in die Haut zu einer Entzündungsreaktion, die sich klinisch in einer Verdickung der dermalen Struktur durch Akkumulation von Kollagen äußert. In der Frühphase der Induktion entsteht ein zelluläres Infiltrat hauptsächlich bestehend aus aktivierten dermalen Makrophagen, monozyten abgeleitete DCs (moDCs) und aktivierten CD11b<sup>+</sup> myeloiden Zellen<sup>65</sup>.

Basierend auf diesen Vorarbeiten wurde im Rahmen dieser Arbeit, die funktionelle Rolle von CD11b<sup>+</sup> myeloiden Zellen im induzierten Mausmodell untersucht.

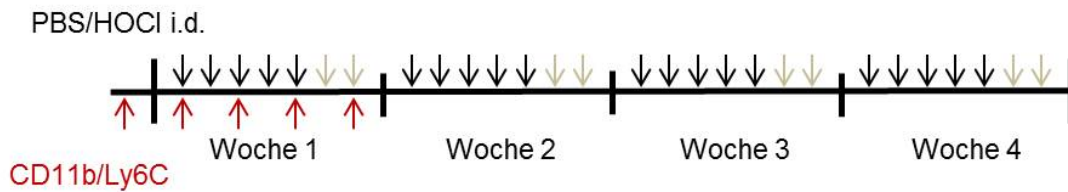


Abbildung 8: Depletion  $CD11b^+/Ly6C^+$  Zellen im HOCl-Modell.

Die schematische Darstellung vom Versuchsaufbau zeigt die intradermale Injektion von HOCl oder PBS über vier Wochen. Die PBS/HOCl Applikation ist mit schwarzen Pfeilen dargestellt. Die grauen Pfeile demonstrieren eine Pause der intradermalen Injektionen mit PBS/HOCl. Die roten Pfeile stellen die Antikörper/Isotyp-Injektionen dar.

Um die funktionelle Rolle von myeloiden Zellen zu untersuchen, wurde im Folgenden eine Mischung aus  $100\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  anti-mouse Ly6C (Isotyp Ratte IgG2a) und  $100\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  anti-mouse CD11b (Isotyp Ratte IgG2b) simultan intraperitoneal (i.p.) gespritzt. Da die Regenerationszeit der  $CD11b^+$  Zellen in Vorversuchen 48 Stunden betrug, wurde der Depletionsantikörper-Cocktail jeden zweiten Tag injiziert. Die entsprechenden Isotyp-Antikörper wurden im direkten Vergleich zu den Depletionsantikörpern in Kontrollmäuse injiziert. Die Depletion erfolgte über einen Zeitraum von 8 Tagen.

Zur Induktion der Sklerodermie wurde ab Tag 1 täglich HOCl und PBS als Kontrolle intradermal injiziert.

Um eine effiziente Depletion von myeloiden Zellen zu erreichen, wurden die Tiere ab Tag 0 alle zwei Tage mit dem Antikörpercocktail oder der Isotypkontrolle behandelt. Die Depletion wurde nach fünf Gaben beendet und bis zum Ende des Versuchs (Tag 5, Tag 7, Tag 10, Tag 28) weiter HOCl oder PBS appliziert (siehe Abb. 8).

### 3.1.1. Kontrolle der Depletionseffizienz

Die Kontrolle der Depletion erfolgte in der 1. Woche mit zusätzlichen Kontrolltieren, welche mit den Depletionsantikörper bzw. Isotypkontrollantikörpern alle 48 Stunden behandelt wurden. Zusätzlich erfolgte eine Fibroseinduktion mit i.d. HOCl. Die Organe wurden nach fünf Tagen aufgearbeitet und die Depletionseffizienz wurde durchflusszytometrisch in Haut, Milz, Blut und Lymphknoten bestimmt. Hierfür wurden folgenden Antikörper für die zytometrische Analyse verwendet: CD45, Zombie Nir (Totfarbstoff), CD11b, TCR, CD19, CD335 (NKp46), Ly6C.

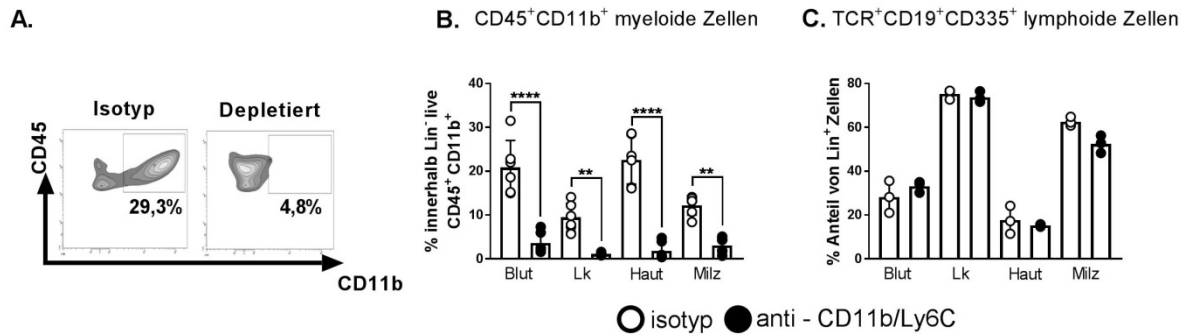


Abbildung 9: Depletionseffizienz.

Die Mäuse wurden alle zwei Tage mit den Depletions- oder den Isotypkontrollantikörpern i.p. gespritzt und zur Induktion von dermalen Fibrose i.d. mit HOCl. Nach 5 Tagen wurden die Organe entnommen und Zellen aus dem Blut, Lymphknoten (Lk), Haut und Milz durchflusszytometrisch untersucht. (A) Durchflusszytometrische Analyse der CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen nach Behandlung mit Depletions- oder den Isotypkontrollantikörpern. (B) Dargestellt ist der Anteil der CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen innerhalb der Lin<sup>-</sup> (TCR T-, (CD19) B-, (CD335) NK- Zellen) als Mittelwert +/- SD (n= 5 Mäuse pro Gruppe) eines Experiments. (C) Anteil der Lin<sup>+</sup> Zellen (TCR, CD19, CD335) nach 5 Tagen Behandlung. Dargestellt als Mittelwert +/- SD (n= 3 pro Gruppe). (\*\* p<0.01 und \*\*\*\* p<0.0001).

Die Ablation der myeloiden CD11b<sup>+</sup> Zellen war in allen Organen signifikant an Tag 5 reduziert (siehe Abb. 9A/B). Im Gegensatz dazu hat die Depletion keinen Einfluss auf den Anteil von T-, B- und NK-Zellen (siehe Abb. 9C).

### 3.1.2. Myofibroblastenaktivierung in der Haut

Ein wichtiges Ereignis in der Pathogenese der systemischen Sklerose ist die Aktivierung von dermalen Fibroblasten und Myofibroblasten. Neben der Kollagenbildung kommt es zu einer gesteigerten Extravasation von Immunzellen aus dem Blut ins Gewebe. Um die Entstehung von Fibroblasten zu bestimmen, wurde die Expression von  $\alpha$ -SMA (*Alpha Smooth- Muscle-Actin*) bestimmt. Es wurde beschrieben, dass in der Frühphase der Erkrankung Myofibroblasten  $\alpha$ -SMA exprimieren, deshalb wurden die Hautschnitte mit einem Antikörper gegen  $\alpha$ -SMA angefärbt und die Gegenfärbung erfolgte mit einem roten Farbstoff (Eosin-Gegenfärbung)<sup>66</sup>.

A.

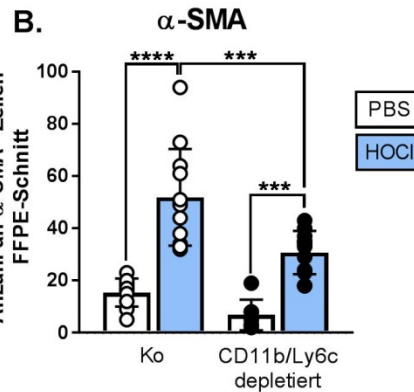
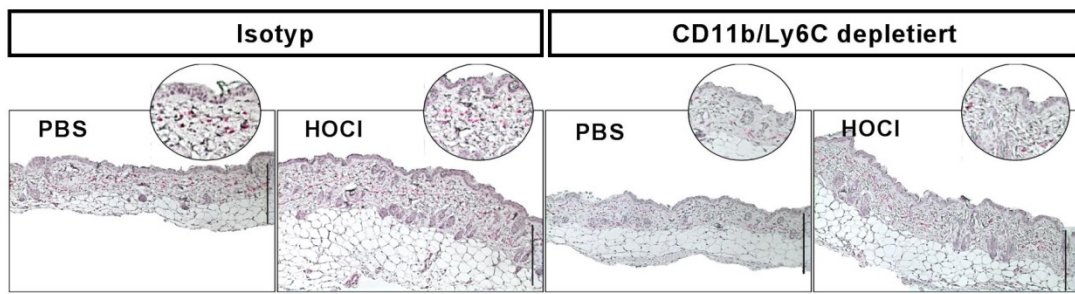


Abbildung 10: Immunhistochemische Analyse der Haut zur Bestimmung von  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>-Zellen nach Depletion myeloider Zellen im HOCl-Modell.

Nach 7 Tagen HOCl-Behandlung wurden Hautstanzen entnommen und Immunhistochemisch auf ihre  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> Expression untersucht. (A.) Histologische Schnitte in einer 20x (Okularvergrößerung) Vergrößerung, wobei direkt über den Bildern eine Vergrößerung zu sehen ist. (B.) Graphische Auswertung der gezählten  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>-Zellen innerhalb der Dermis. Der Graph zeigt Mittelwerte  $\pm$  SD von zwei separaten Versuchen mit je 6-9 Tieren, Kalibrierungsbalken spannen 200 $\mu$ m (\*\*\*  $p < 0.001$  und \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ). Ko: Kontrolle; FFPE: Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe

Die histologischen Schnitte der Hautstanzen zeigen Ausschnitte nach 7 Tagen HOCl/PBS Behandlung und zusätzlicher Antikörpergabe (5 Injektionen).

Nach 7 Tagen erkennt man einen signifikanten Anstieg der  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> Zellen in den HOCl behandelten Kontrolltieren (Isotyp) verglichen zu den PBS-Kontrolltieren. In Abwesenheit von CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> myeloiden Zellen zeigte sich eine Reduktion der  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> Zellen in der HOCl behandelten Gruppe verglichen zur Isotyp-behandelten HOCl Kontrolle (siehe Abb.10A/B).

### 3.1.3. Histologische Bestimmung des Kollagengehalts der Haut

Um eine Aussage über den fibrotischen Status der Erkrankung zu erlangen, wurden histologische Analysen durchgeführt. Die Masson-Goldener-Trichrom (GT) Färbung ermöglicht eine exakte Darstellung und Differenzierung von Keratin und Muskelfasern (rötlich) und Kollagen (blau)

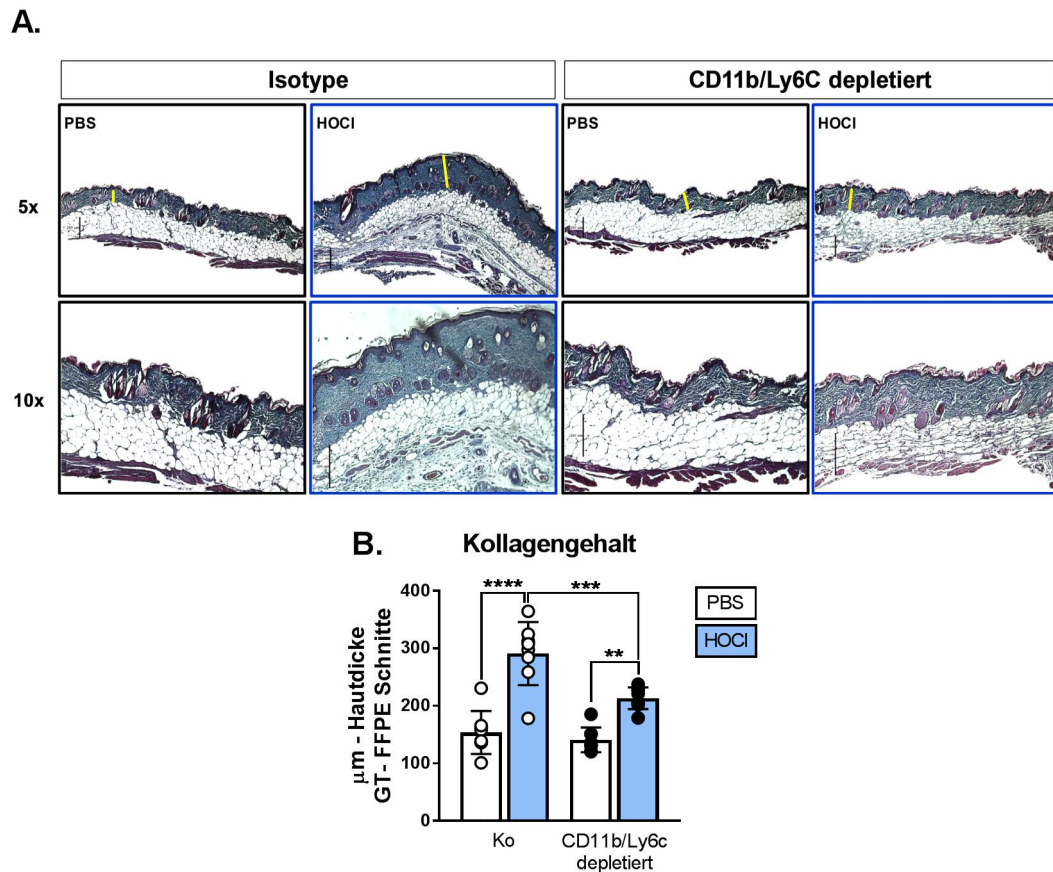


Abbildung 11: Reduktion der Hautfibrose nach Depletion  $CD11b^+/Ly6C^+$  myeloider Zellen im HOCI-Modell.

Nach 28 Tagen HOCI oder PBS Behandlung und zusätzlicher Depletion myeloider Zellen wurden Hautstanzen entnommen und histologisch mittels Masson-Goldner-Trichrom Färbung analysiert. (A) Dargestellt sind mit schwarzer Umrandung die PBS behandelten Tiere und mit blauer Umrandung die HOCI-Tiere. Zusätzlich ist auf der linken Seite die Behandlung mit der Isotypkontrollantikörpern zu erkennen, rechts die Haut Depletionsantikörper-behandelter Tiere. Die gelbe Distanzlinie zeigt exemplarisch die Messbereiche. (B) Der Graph zeigt den Mittelwert  $\pm$  SD. Gezeigt wird die gemessene histologische Hautdicke. Kalibrierungsbalken spannen  $200\mu\text{m}$  ( $n=6-9$  Mäuse pro Gruppe) (\*\*  $p<0.0021$ , \*\*\*  $p<0.0002$  und \*\*\*\*  $p<0.0001$ ). Ko: Kontrolle; FFPE: Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe

In der Isotypkontrollgruppe wird ein signifikanter Anstieg der dermalen Hautdicke nach HOCI-Behandlung über vier Wochen erkennbar (siehe Abb. 11B). Wohingegen die Depletion in der Frühphase der HOCI-Behandlung zu einer signifikanten Reduktion von Kollagen in der Dermis verglichen zur HOCI Kontrollgruppe (Isotyp) führt.

### 3.1.4. Analyse des kutanen zellulären Infiltrates nach Depletion im induzierten Mausmodell

An der Ausbildung der Erkrankung sind drei zentrale Prozesse beteiligt: Gefäßschädigung, Induktion von autoimmunen Prozessen und überschießende Kollagenablagerung in der Haut

durch aktivierte Fibroblasten. Ein frühes Ereignis ist eine gesteigerte Extravasation von Immunzellen. Im vorangegangenen Kapitel verminderte die Depletion der myeloiden Zellen in der Frühphase der Fibroseinduktion die Krankheitssymptome wie Myofibroblastenaktivierung und anschließende Kollagenakkumulation, jedoch ist bisher nicht klar, welche Immunzellen dabei eine funktionelle Rolle spielen und welche Subpopulationen der myeloiden Linie die Haut nach Depletion erneut besiedeln.

#### **3.1.4.1 Zelluläre Infiltration der Haut**

Um die zelluläre Zusammensetzung und die Aktivierungsstadien der Zellen in der Haut nach der Depletion zu quantifizieren, wurden Hautstanzen mechanisch disruptiert, enzymatisch verdaut, die Zellen gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

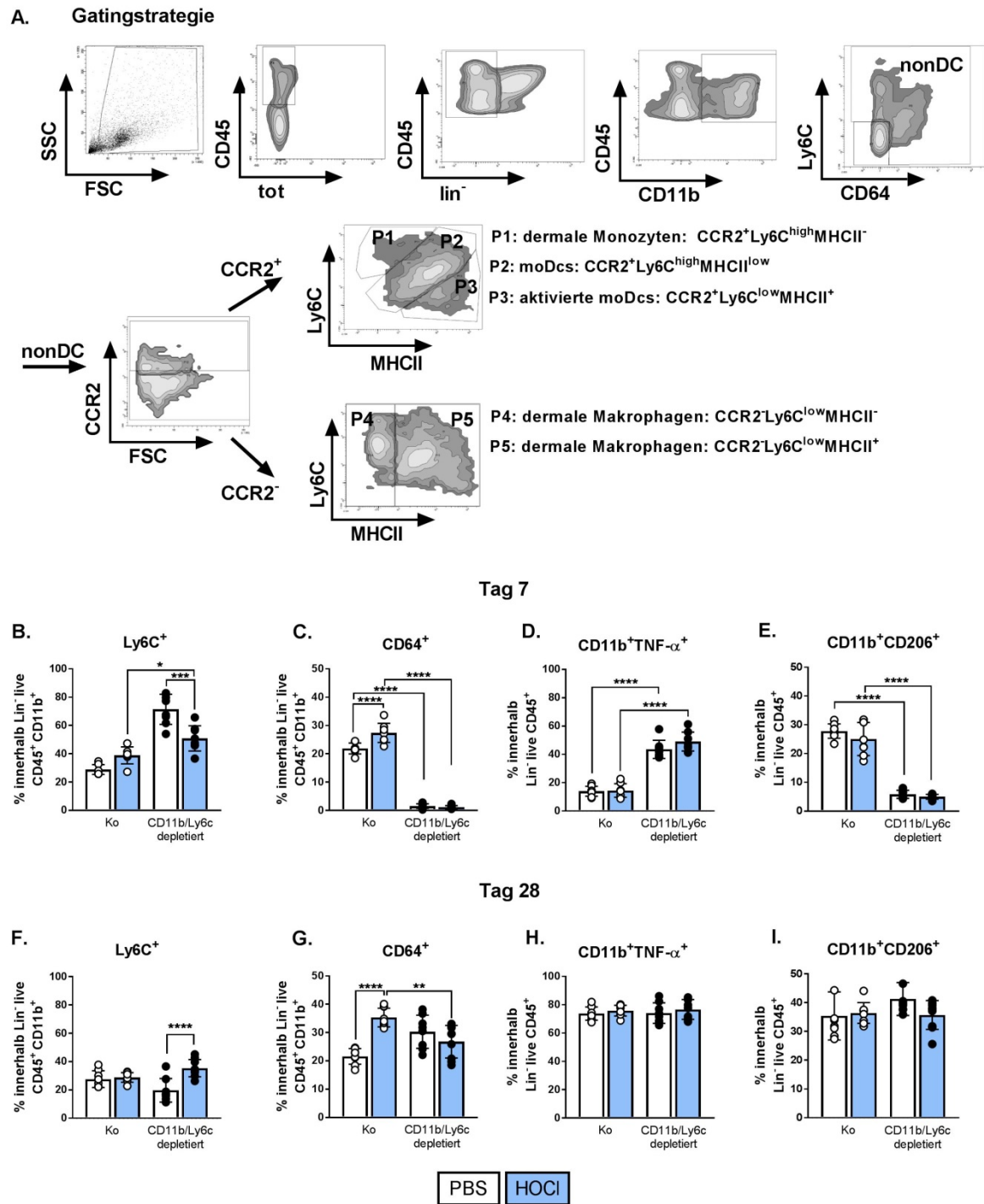


Abbildung 12: Durchflusszytometrische Analyse des dermalen Infiltrats.

A) Gatingstrategie: SSC/FSC Debrisausschluss und lebende CD45<sup>+</sup> Zellen wurden als negativ für CD19, NKp46 und TCRbeta (LIN) ausgewählt. LIN<sup>-</sup> Zellen wurden differenziert in Ly6C<sup>low</sup>CD64<sup>low</sup> dermale DC und Ly6C<sup>high</sup>CD64<sup>high</sup> nicht dendritische Zellen (nonDC). NonDC wurden weiter auf ihre CCR2-Expression unterschieden: CCR2<sup>+</sup> Zellen wurden mit Hilfe der MHCII-Expression in 3 Populationen untergliedert: P1: dermale Monozyten: CCR2<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup>MHCII<sup>-</sup>; P2: moDCs: CCR2<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup>MHCII<sup>low</sup>; P3: aktivierte moDCs: CCR2<sup>+</sup>Ly6C<sup>low</sup>MHCII<sup>+</sup>; CCR2<sup>-</sup> Zellen wurden in MHC<sup>low</sup> (P4) und MHC<sup>high</sup> (P5) dermale Makrophagen unterteilt. (B-I) Gezeigt ist die Frequenz (%) der Ly6C<sup>+</sup> oder CD64<sup>+</sup> innerhalb der Lin<sup>+</sup>live CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen sowie die Frequenz von CD11b<sup>+</sup>TNF<sup>+</sup> oder CD11b<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> Zellen in CD45<sup>+</sup>live Lin<sup>-</sup> Zellen in der Haut an Tag 7(B-E) und Tag 28(F-I). Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SD aus einem von 3 Experimenten mit n=6-9. (\* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 und \*\*\*\* p<0.0001).

Nach 7 und 28 Tagen wurden Hautstanzen enzymatisch verdaut und durchflusszytometrisch untersucht. Hierfür wurden tote Zellen ausgeschlossen, um dann mit einem allgemeinen Immunzellmarker (CD45) die Zellen von Interesse einzugrenzen. Weiterführend wurden T-, B-, und NK-Zellen ausgeschlossen. Innerhalb der CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> myeloiden Zellen konnten mit Hilfe von Ly6C und CD64 dermale DCs und myeloide nicht DCs unterschieden werden. Mit Hilfe des Chemokinrezeptors 2 (CCR2) wurde zwischen CCR2<sup>+</sup> und CCR2<sup>-</sup> Zellen unterschieden. Innerhalb der CCR2<sup>+</sup> Zellen konnte mittels Ly6C und MHCII die dermalen Monozyten (P1), die monozytär abgeleiteten DCs (moDCs) (P2) und die aktivierten moDCs (P3) unterschieden werden. Innerhalb der CCR2<sup>-</sup> Zellen wurden sich dermalen Makrophagen (MHCII Expression) angeschaut. An Tag 7, also zwei Tage nach Beendigung der 5 Tage anhaltenden CD11b/Ly6C-Depletion findet man in der Zell-ablatierten Haut als Antwort auf das Öffnen der zellulären Nischen in der Haut vor allem eine Repopulation mit Ly6C<sup>+</sup> Zellen (siehe Abb. 12B). CD64<sup>+</sup> differenzierte Makrophagen sind an Tag 7 signifikant ablatiert (siehe Abb. 12C). Die CD11b<sup>+</sup> Zellen in depletierter Haut zeigen an Tag 7 einen TNF- $\alpha$  Phänotyp, wohingegen der Mannose-Rezeptor CD206, als Anzeichen differenzierter Makrophagen eher weniger zu finden ist (siehe Abb. 12 D/E).

Der Influx monozytärer Zellen in die fibrotische Haut ist auch an Tag 28 noch zu erkennen. Die Kontrolltiere ohne Depletion haben an Tag 28 durch die HOCl-Behandlung einen signifikanten Anstieg differenzierter Makrophagen erreicht (CD64<sup>+</sup>) (siehe Abb. 12 G). In den depletierten Tieren unterscheidet sich die Frequenz der Ly6C<sup>+</sup> Zellen nicht signifikant zu den beiden PBS Kontrollen (siehe Abb. 12F). Der Influx von monozytären Zellen an Tag 7 konnte das zelluläre Defizit an Tag 28 in der depletierten Haut nicht vollständig ausgleichen. Depletierte Tiere haben somit an Tag 28 weniger differenzierte Makrophagen in der Haut, die sich aufgrund der TNF- $\alpha$  und CD206 Expression jedoch nicht von Makrophagen in Kontrolltieren unterscheiden lassen (siehe Abb. 12H/I).

P1: dermale Monozyten: CCR2<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup>MHCII<sup>-</sup>  
 P2: moDCs: CCR2<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup>MHCII<sup>low</sup>  
 P3: aktivierte moDCs: CCR2<sup>+</sup>Ly6C<sup>low</sup>MHCII<sup>+</sup>

P4: dermale Makrophagen: CCR2<sup>-</sup>Ly6C<sup>low</sup>MHCII<sup>-</sup>  
 P5: dermale Makrophagen: CCR2<sup>-</sup>Ly6C<sup>low</sup>MHCII<sup>+</sup>

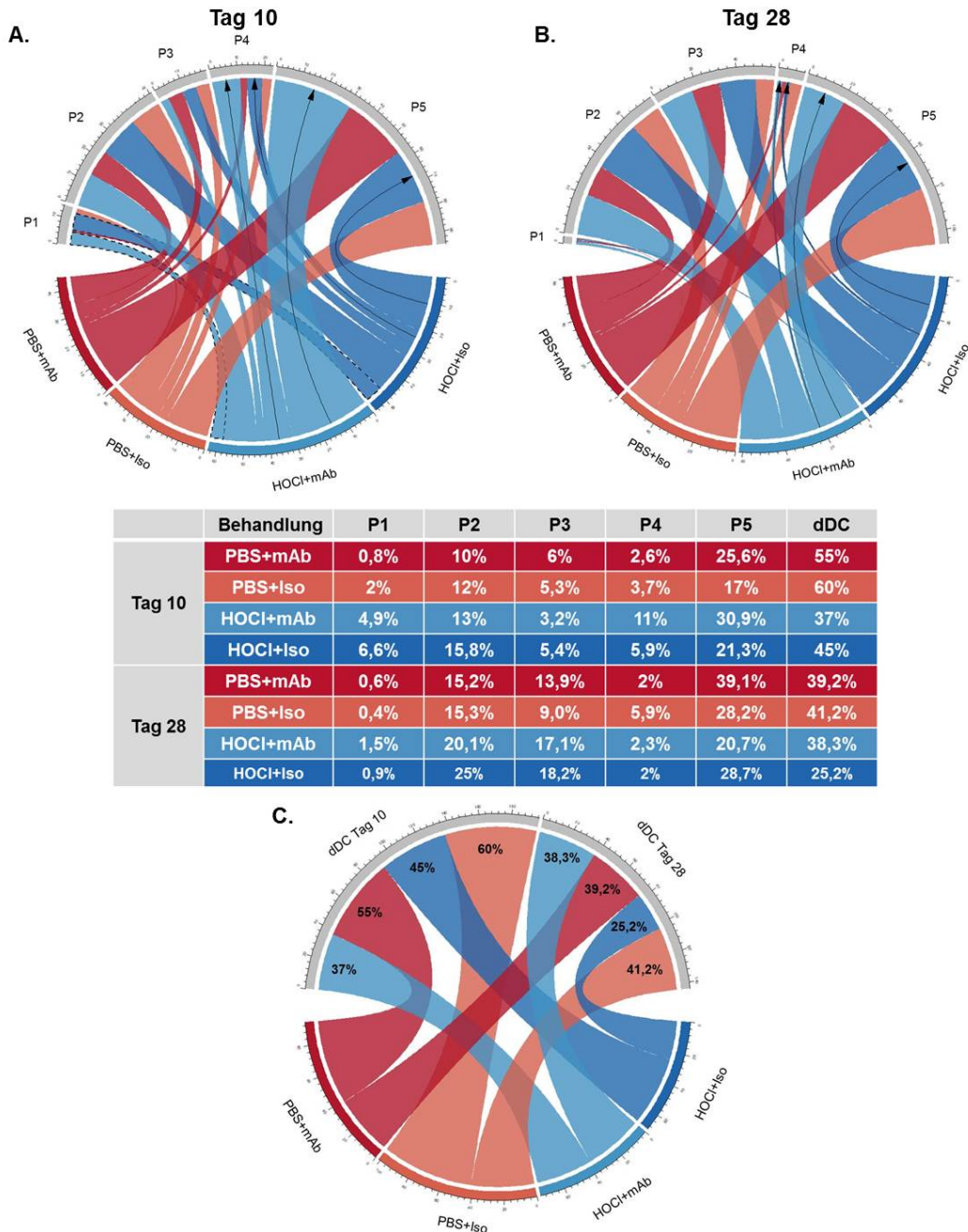


Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analysen des dermalen Infiltrats nach Depletion myeloider Zellen im HOCl-Modell.

Die Chorddiagramme stellen die prozentualen Anteile der dermalen CD11b<sup>+</sup> Zellen dar. Die Zellpopulation P1-P5 im Diagramm sind proportional zu den absoluten Zahlen der CD11b<sup>+</sup> Subpopulation. Die prozentualen Anteile von P1-P5 sind innerhalb der Behandlungsgruppen PBS+Iso, HOCl+Iso, PBS+mAb und HOCl+mab an Tag 10 (A) und Tag 28 (B) dargestellt. (C) Der Graph repräsentiert die Verteilung von dermalen DCs an Tag 10 und Tag 28. Dargestellt sind die gepoolten Daten bestehend aus n=6-9 Mäuse pro Gruppe. Die relativen Prozente verteilen sich von der Behandlungsgruppe zu P1-P5 (Iso=Isotyp; mab=Depletionsantikörper)

Anhand der Populationen P1-P5 (P1: dermale Monozyten, P2: moDCs, P3: aktivierte moDCs; (P4) MHCII<sup>low</sup> und MHC<sup>high</sup> (P5) dermale Makrophagen) ist es möglich, das myeloide Infiltrat der Haut näher zu charakterisieren und zu verfolgen, welche Auswirkung die konstante

inflammatorische Stimulierung der Hautzellen über HOCl auf die Einwanderung bzw. die Repopulation der Haut hat. Die Chorddiagramme stellen die prozentuale Verteilung der einzelnen Behandlungsgruppen (PBS+mAb, PBS+Iso, HOCl+mAb, HOCl+Iso) mit P1-P5 dar. Durch die Behandlung von HOCl über 28 Tage findet sich in der Haut vermehrt nonDC, also keine DCs (bestehend aus Monozyten und Makrophagen, von 58,8 % in PBS auf 74,8% in HOCl) wohingegen die Frequenz der dermalen DCs (dDC) (von 41,2 auf 25,2%) abnimmt (siehe Abb. 13C). Durch die Depletion der CD11b<sup>+</sup>/Ly6C<sup>+</sup> Zellen in Woche 1 des Experiments konnte die nonDC-Dominanz nach vierwöchiger PBS/HOCl-Behandlung vermindert werden 60,8% in PBS und 61,7% in HOCl, bei gleichbleibender dDC-Frequenz (39,2%/38,3%) (siehe Abb. 13C).

Betrachtet man sich die Frequenzen an Tag 10 in den Monozyten/moDC-Populationen (P1-P3) genauer so fällt auf, dass die Monozytenfrequenzen in P1 nach HOCl hier sogar leicht rückläufig ist (von 6,6% ohne Depletion auf 4,9% mit Depletion, gestrichelte Umrandung) (siehe Abb. 13A). Die Frequenz der dermalen Makrophagen an Tag 10 nimmt jedoch sowohl in P4 von 5,9% ohne Depletion auf 11% mit Depletion zu (schwarze Pfeile). Auch für P5 findet man ohne Depletion 21,3% und mit Depletion 30,9%. Dies spricht für die Beobachtung an Tag 7, dass einwandernde Monozyten aus dem Blut die Nischen der Haut nach Depletion auffüllen und dann zu dermalen Makrophagen differenzieren (siehe Abb. 13A). Spannenderweise ist eine frühe Depletion in Woche 1 in der Lage die Prominenz von aktivierten MHCII<sup>+</sup> dermalen Makrophagen (P5) nach HOCl Behandlung signifikant zu reduzieren.

#### 3.1.4.2 Genexpressionsanalyse der Haut

Um einen besseren Einblick darüber zu bekommen, welche molekularen Veränderungen die Depletion in der Frühphase der Fibroseinduktion in der Haut hervorruft, wurden Expressionsanalysen von myeloiden Signatur-Genen durchgeführt. Die Rückenhaut wurde nach 7 und 28 Tagen HOCl-Injektion entnommen und aus der extrahierten RNA Expressionsprofile für die Gene *CCR2*, *TNF- $\alpha$*  und *CD206* mittels quantitativer RT-PCR erstellt.

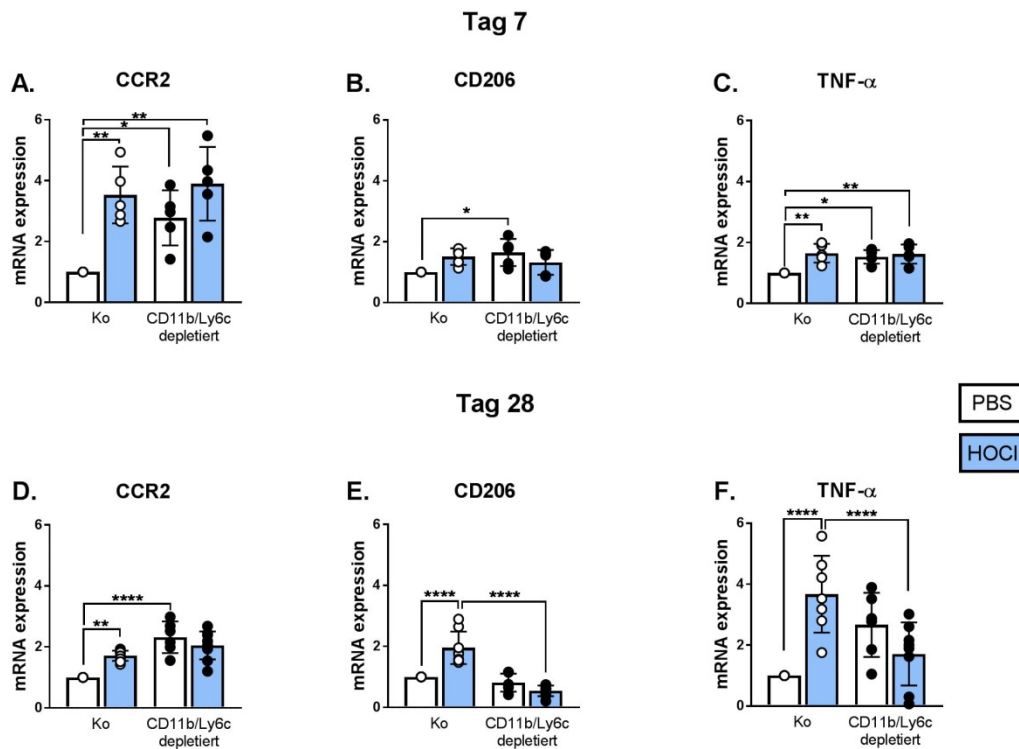


Abbildung 14: Expression der Gene CCR2 (A,D), CD206 (B,E) und TNF- $\alpha$  (C,F) in rasierter Rückenhaut an Tag 7 und 28 von HOCl-Tieren.

Dargestellt sind die mRNA-Expressionlevel (Mittelwerte  $\pm$  SD, n=6-9 Mäuse) an zwei Zeitpunkten: Tag 7 und Tag 28. Alle Daten basieren auf qRT-PCR Ergebnissen, berechnet relativ zur PBS + Isotyp Kontrolle und normalisiert auf das *Housekeeping* Gen *hprt* (\* $p$ <0.05, \*\*  $p$ <0.01, \*\*\*  $p$ <0.001 und \*\*\*\*  $p$ <0.0001).

CCR2 ist ein wichtiger Chemokinrezeptor für die Rekrutierung von Monozyten aus dem Knochenmark und in das Gewebe. Die Genexpressionanalyse zeigt, dass nach HOCl-Behandlung vermehrt CCR2 in der Haut exprimiert wird (Tag 7, Tag 28). Des Weiteren ist die TNF- $\alpha$  Expression an Tag 7 nach HOCl-Behandlung signifikant zur PBS-Kontrolle erhöht. Die CCR2 Expression ist verstärkt in allen Tieren nach Depletion myeloider Zellen zu finden, da in diesen Tieren durch das Öffnen der Gewebnischen eine vermehrte Zellrekrutierung zu erwarten ist (siehe Abb. 14A). Die Ablation myeloider Zellen führt zu einem Anstieg von TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> und CD206<sup>+</sup> Zellen in der Rückenhaut nach intradermaler Behandlung. (siehe Abb. 14B/C). An Tag 28 findet man in fibrotischer Haut eine verstärkte CCR2, TNF-a und CD206 Expression, Marker, die mit einem (pro-)fibrotischen Phänotyp assoziiert sind. Durch die Depletion myeloider Zellen in Woche 1 hat zwar eine starke Zellrekrutierung über CCR2 stattgefunden (erhöhtes CCR2-Expression) jedoch wurden nach 28 Tagen nicht dieselben Expressionslevel für TNF-a und CD206 wie in den nicht depletierten Kontrolltieren erreicht (siehe Abb. 14D/E/F).

### **3.2. CCR2 vermittelte Rekrutierung von monozytären Zellen in der fibrotischen Haut**

Wir konnten zuvor zeigen, dass Monozyten als erste Zellen in entzündliche, fibrotische Haut einwandern<sup>65</sup>. Die Rekrutierung von Monozyten in das entzündliche Gewebe und deren Differenzierung zu Makrophagen/DCs ist nur ungenügend beschrieben. Ein wichtiger Faktor für die monozytäre Zellrekrutierung ist der Chemokinrezeptor CCR2. Monozytäre Zellen benötigen CCR2, um aus dem Knochenmark ins Blut und von dort in entzündliche Gewebe zu wandern. Untersuchungen im Sklerodermiemodell demonstrierten einen signifikanten Anstieg von der CCR2 Expression (siehe Abb. 14A/D) und CCR2<sup>+</sup> Zellen in der HOCl-behandelten Rückenhaut nach 28 Tagen (Daten nicht gezeigt).

Um genauere Einblicke in die Abhängigkeit der Monozytenrekrutierung über CCR2 im HOCl-anhängigen Mausmodell der Fibrose zu erlangen, wurde im nächsten Kapitel eine CCR2 KO Maus verwendet.

#### **3.2.1. Analyse des dermalen Infiltrats in CCR2 KO Tieren**

Das Fehlen des Chemokinrezeptor 2 führt zu einem Defizit in der Rekrutierung von Monozyten aus dem Knochenmark und anderen Organen in die Blutbahn und in entzündetes Gewebe. Monozyten werden jedoch nicht nur aus dem Knochenmark rekrutiert, sondern auch im jungen Alter ist die Leber noch ein Reservoir für Monozyten<sup>67</sup>. Das Fehlen von CCR2 resultiert in einer geringeren Anzahl an inflammatorischen Ly6C<sup>+</sup>CD43<sup>-</sup> Monozyten, jedoch aber einer Ansammlung von patrollierenden Ly6C<sup>low</sup>CD43<sup>+</sup> Monozyten im Blut. CD43 (Leukosialin) ist ein transmembranes Zelloberflächenmolekül, was auf T-Zellen, Monozyten und Granulozyten zu finden ist. Mittels Ly6C, einem myeloiden Marker, lassen sich verschiedene Stadien von Monozyten definieren<sup>68</sup>. Um die Relevanz von CCR2 und die Rekrutierung von Monozyten in entzündliches Gewebe zu untersuchen, wurden CCR2 KO über vier Wochen mit PBS oder HOCl intradermal behandelt (siehe Abb. 15A).

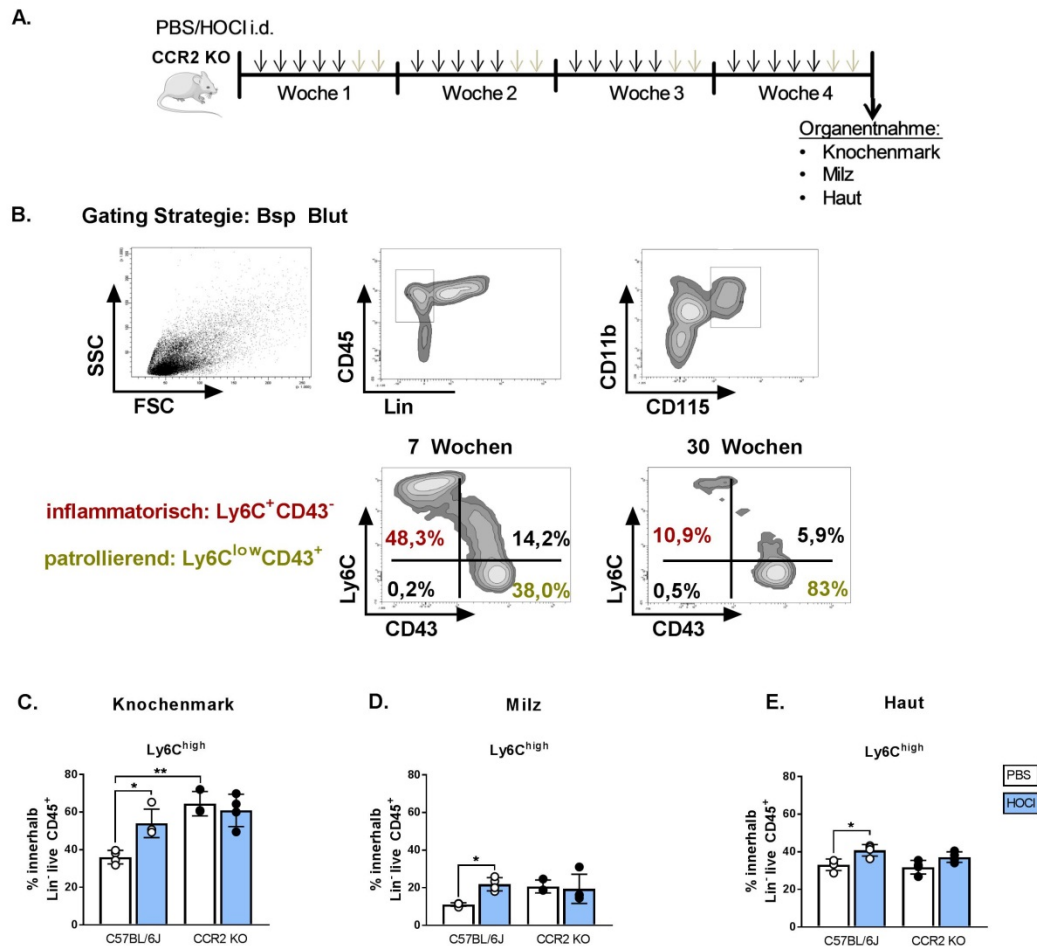


Abbildung 15: Monozytenrekretierung in CCR2 KO Mäusen nach HOCl-Behandlung über vier Wochen.

(A) Schematische Darstellung zur Verdeutlichung der intradermalen Injektionen mit HOCl und PBS über vier Wochen. (B) Dargestellt ist die Gatingstrategie. Zunächst wurde ein Einschluss von Zellen im SSC/FSC vorgenommen, anschließend ein Doublet Ausschluss (hier nicht gezeigt), um danach die lebenden CD45<sup>+</sup> Zellen zu betrachten und die T-, B- und NK-Zellen auszuschließen. Schließlich wurden die CD11b<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup>(CSF1R)<sup>+</sup> Zellen eingegrenzt, um dann zwischen inflammatorischen Ly6C<sup>high</sup>CD43<sup>-</sup> und patrollierenden Ly6C<sup>low</sup>CD43<sup>+</sup> zu differenzieren. (C-E) Die Graphen zeigen prozentuale Anteile von Ly6C<sup>high</sup> Zellen innerhalb von CD45<sup>+</sup>Immunzellen nach 28 Tagen in der Haut von C57BL/6J und CCR2 KO Tieren. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD. (n=4-6 Mäuse pro Gruppe) (\*p<0.05, \*\* p<0.01).

Durchflusszytometrische Analysen wurden vor Beginn der Experimente durchgeführt, um den Phänotyp in den CCR2 KO Mäusen zu bestätigen. Auf mRNA Level wurde zuvor ein Fehlen von CCR2 in den Tieren festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Im Alter von 7 Wochen haben CCR2 KO 48,3% inflammatorische Ly6C<sup>+</sup>CD43<sup>low</sup> Monozyten im Blut, wohingegen die Tiere nach 30 Wochen nur noch 10,9% inflammatorische Ly6C<sup>+</sup>CD43<sup>low</sup> Monozyten aufweisen. CCR2 KO Tiere sollen vorrangig Monozyten vom patrollierenden Phänotyp (Ly6C<sup>low</sup>CD43<sup>+</sup>) in der Zirkulation aufweisen, da das Fehlen von CCR2 zu einem Defizit in der Rekrutierung von Monozyten führt. Daher wurden in den weiteren Versuchen Tiere verwendet, die mindestens 30 Wochen alt waren (siehe Abb. 15B).

Nach vier Wochen Behandlung mit PBS/HOCI wurde das Knochenmark, die Milz und die Haut von C57BL/6J und CCR2 KO Tieren aufgearbeitet und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Behandlung mit HOCl führt im Knochenmark zu einem prozentualen Anstieg von Ly6C<sup>high</sup> Monozyten im Vergleich zur PBS Kontrolle. Die Frequenz Ly6C<sup>high</sup> Monozyten im Knochenmark der CCR2 KO Maus ist unabhängig von der Behandlung mit PBS oder HOCl von ca. 40% auf 60% erhöht im Vergleich zum WT (siehe Abb. 15C). Dies ist dem Defekt der CCR2 KO im Knochenmarkregress geschuldet. Auch in der Milz und Haut fördert die HOCl-Behandlung beim WT das Einwandern von Ly6C<sup>high</sup> Zellen (siehe Abb. 15D/E). Die Milz der CCR2 KO Tiere zeigt keinen signifikanten Anstieg der Ly6C<sup>high</sup> Frequenz nach HOCl-Gabe. Jedoch werden bei CCR2 KO Tieren, unabhängig von der HOCl-Gabe, inflammatorische Monozyten in die Haut rekrutiert, wenn auch abgeschwächt (siehe Abb. 15E). Die CCR2 Defizienz hat einen partiellen Einfluss auf die HOCl-vermittelte Erhöhung der Monozytenfrequenz in Milz und Haut.

### 3.2.2. Analyse des Kollagengehalts in der Haut

Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die beobachteten Veränderungen in der entzündlichen Phase der Fibroseentwicklung den späteren fibrotischen Phänotyp beeinflussen können, haben wir Hautstanzen von WT und CCR2 KO Tieren einer Masson-Goldner-Trichrom Färbung unterzogen.

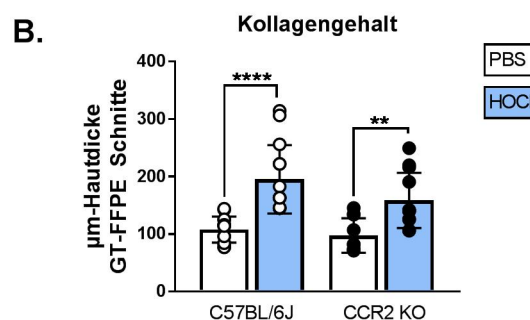
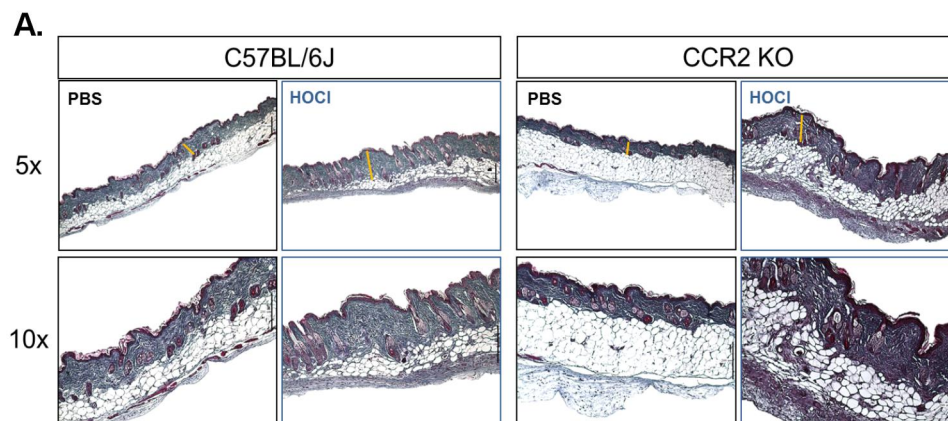


Abbildung 16: Histologische Analysen von fibrotischer Haut in der CCR2 KO Maus nach 28 tägiger HOCl Behandlung.

Mittels Goldner-Trichrom Färbung wurden nach 28 Tagen Hautstanzen histologisch analysiert. (A) Der Kollagengehalt in der Dermis wurde mit einer Distanzlinie ermittelt. Auf der linken Seite sind die C57BL/6J Kontrollen abgebildet (PBS in schwarz, HOCl in blau). Auf der rechten Seite die CCR2 KO Mäuse. (B) Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus einem von 3 Experimenten mit  $n=6-9$  (\*\*  $p<0.01$ , \*\*\*\*  $p<0.0001$ ). FFPE: Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe

Nach 28 Tagen sieht man im Vergleich zur PBS Kontrolle einen signifikanten Anstieg von Kollagen in den HOCl-behandelten Wildtyp-Tieren. In den CCR2 KO Tieren konnte nach HOCl Gabe ebenfalls eine Kollagenakkumulation beobachtet werden (siehe Abb. 16). Die CCR2-Defizienz hatte somit keine Auswirkung auf die Kollagenakkumulation nach HOCl-Gabe.

### 3.3. Fibroseentwicklung im spontanen Fra-2-Mausmodell

Das induzierte Mausmodell mittels HOCl spiegelt nicht alle Aspekte der Sklerodermie, wie man sie bei Patienten findet, wider. Spontanes Auftreten, vaskuläre Veränderungen und Autoimmunität sind nur einige der Parameter, die in Patienten vorgefunden werden, durch die induzierten Modelle aber nicht alle erfasst werden können.

Die Fra-2 Mauslinie bietet hier eine Annäherung. Aufgrund einer Überexpression von *fos-related antigen 2 (fra-2)* unter dem (Haupthistokompatibilitätskomplex I) H2Kb-Promoter entwickeln die Tiere zunächst eine Vaskulopathie, eine Gewebsentzündung und letztlich Gewebsfibrose in Haut, Lunge, Leber und Niere. Man unterscheidet hier 3 Phasen: eine Entwicklung der Vaskulopathie vom Absetzen bis zur Lebenswoche (LW 3-4), eine entzündliche Phase mit einem Höhepunkt in LW 5-7 und eine anschließende (pro) fibrotische Phase ab Woche 10. Diese Lebenserwartung der Fra-2 Linie ist aufgrund des Einsetzens einer schweren Niere/Lungen-fibrose auf 17 Wochen beschränkt.

#### 3.3.1. Monozyten in fibrotischer Haut

Um die monozytäre Zusammensetzung und die Differenzierung in der Haut von Fra-2 Mäusen zu quantifizieren, wurden Hautstanzen mechanisch disruptiert, enzymatisch verdaut, die Zellen gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Um einen Einblick in die Monozytendifferenzierung über die Zeit zu erhalten, wurde eine Kinetik von den Tieren in Woche 3, 5, 9, 12, 16 erstellt.

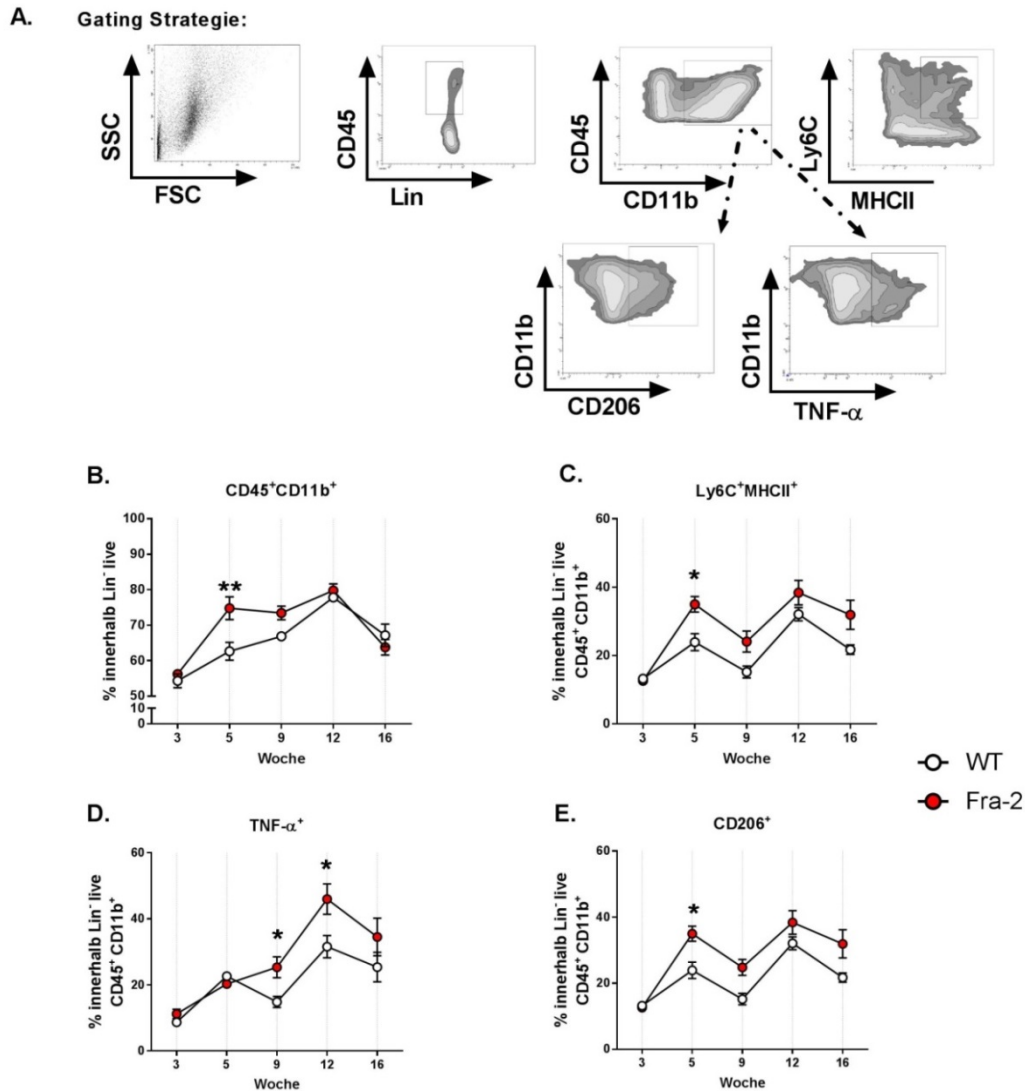


Abbildung 17: Kinetik der dermalen Infiltration bei Fra-2 Mäusen.

(A) Zunächst wurde ein Einschluss von Zellen im SSC/FSC vorgenommen, anschließend ein Doublet Ausschluss (hier nicht gezeigt), um danach die lebenden CD45<sup>+</sup> Zellen zu betrachten und um schließlich CD11b<sup>+</sup> Zellen einzugrenzen. Weiterführend wurden die Zellen mit Ly6C/MHCII auf ihre Aktivierung untersucht. CD11b<sup>+</sup> positive Zellen wurden ebenso auf ihre TNF $\alpha$  und CD206 Expression untersucht. (B) Dargestellt sind die prozentualen Anteile von CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen nach Woche 3, 5, 9, 12 und 16 in der Haut von Fra-2 Tieren. (C) Prozentuale Anteile der Ly6C<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen. (D) CD206<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen. Dargestellt in Prozent. (E) Graphische Darstellung der TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus einem von 3 Experimenten mit n=3-9 (\*\* p<0.01, \*\*\*\* p<0.0001).

Die Analyse der myeloiden CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen in den Fra-2 Tieren zeigte einen signifikanten Anstieg in Woche 5 in der Haut im Vergleich zum Wildtyp und den Fra-2 Tieren in Woche 3 (siehe Abb. 17B). In der Kinetik wird sichtbar, dass besonders die aktivierten Monozyten (Ly6C<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>) in Woche 5 im direkten Vergleich zum Wildtyp und Fra-2 positiven Mäusen in Woche 3 signifikant erhöht sind (siehe Abb. 17C).

## Ergebnisse

Zellen, die in der Fra-2 Haut zu finden sind exprimieren Marker wie CD11b, Ly6C und CD206, zeigen ab Woche 5 einen aktivierten Phänotyp (MHCII<sup>+</sup>) und produzieren ab Woche 9 vermehrt TNF- $\alpha$  (siehe Abb. 17D/E). Die in Abbildung 17 D/E dargestellten Daten zeigen, dass sich in Woche 5 vermehrt CD206<sup>+</sup> Makrophagen in der Haut aufhalten, wohingegen dann eine mögliche Differenzierung zu TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen in Woche 9 und 12 stattfindet.

### 3.3.2. Analyse der Hautfibrose

Um die Kollagenbildung in der Haut von Fra-2 Mäusen zu bestimmen, wurden Stenzen in Woche 5 und Woche 16 entnommen und histologisch untersucht. Die Goldner Trichrom Färbung ermöglicht eine Quantifizierung von Kollagen mittels Messung der Dicke der Dermis. Hierbei wurde zwischen Wildtyp und Fra-2 Tieren unterschieden.

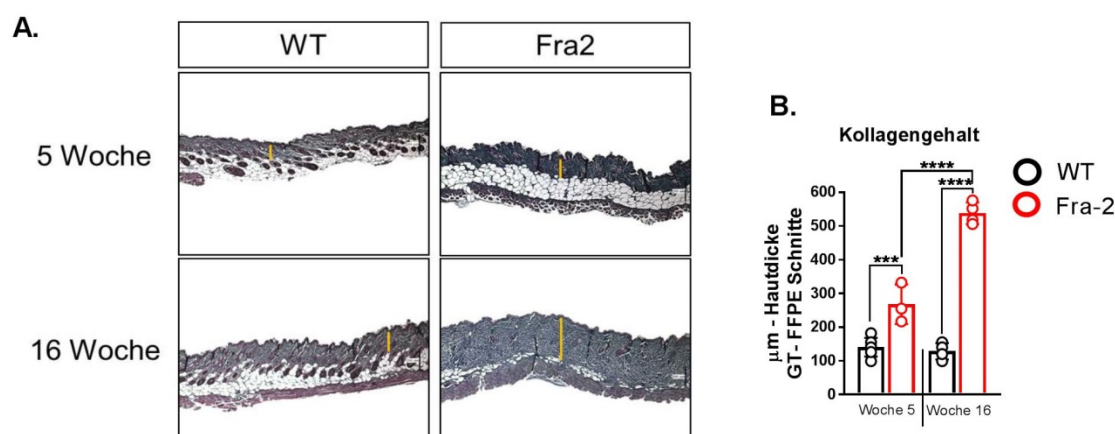


Abbildung 18: Bestimmung des Kollagengehalts der Haut in Fra-2 Tieren.

Hautstanzen wurden nach 5 und 16 Wochen histologisch mit einer Masson-Goldner-Trichrom (GT) Färbung untersucht. (A) Der Kollagengehalt in der Dermis mittels einer Distanzlinie ermittelt. Auf der linken Seite ist der Wildtyp (WT) abgebildet und auf der rechten Seite die Fra-2 Maus. Die dargestellten Schnitte stammen repräsentativ aus einem Versuch nach 5 Wochen und 16 Wochen. (B) Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus einem von 3 Experimenten mit  $n=3-9$  (\*\*\*)  $p<0.001$ , \*\*\*\*  $p<0.0001$ ). FFPE: Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe

In Woche 5 ist ein signifikanter Anstieg von Kollagen in der Dermis in der Fra-2 Maus im Vergleich zum WT zu erkennen. Prominenter wird dieser Unterschied mit Zunahme des Schweregrades der Erkrankung in Woche 16. In den Fra-2 Tieren konnte über den zeitlichen Verlauf bis zur Woche 16 eine stetige Kollagenakkumulation, ebenso eine Reduktion des Fettanteils der Haut, beobachtet werden (siehe Abb. 18). In Woche 16 wurden Lungenschnitte von Fra-2 Tieren untersucht und eine Lungenfibrose festgestellt (Daten nicht dargestellt).

### 3.4. L-RNA Aptamer Blockade des CCR2/CCL2 Signalweges im induzierten und spontanen Mausmodell

Vorangegangene Versuche legen eine funktionelle Rolle von Monozyten in der Frühphase der dermalen Fibrose nahe, denn die Depletion von myeloiden Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen CD11b und Ly6C in der Frühphase resultierte in einer verminderten Fibrose. Jedoch ist die Anwendung dieser Antikörper nur eingeschränkt möglich, da in den Versuchstieren nur bis zu fünf Injektionen wirksam waren. Die Depletionsantikörper werden aus der Ratte isoliert und induzieren mit der Zeit im Mausmodell eine Antikörperproduktion gegen die xenogenen gespritzten Ratten-Antikörper.

Um in den weiteren Versuchen die Rolle von Monozyten genauer zu charakterisieren, mit besonderem Augenmerk auf die Wanderung von Monozyten ins entzündete Gewebe, haben wir uns den CCR2/CCL2 Signalweg genauer angeschaut. CCR2 bindet die Chemokine CCL2 und CCL7<sup>69</sup>. Wir konnten zuvor bereits zeigen, dass nach vierwöchiger HOCl-Gabe in Wildtypmäusen vermehrt CCR2 in der Haut exprimiert wird (siehe Abb. 14A). Da jedoch in der CCR2 KO Maus, trotz fehlendem Monozytenrekrutment aus dem Knochenmark, Ly6C<sup>high</sup> Monozyten im Blut detektiert werden konnten, wurde in den nächsten Versuchen ein spezifischer L-RNA Aptamer (mNOX-E36, Noxxon Pharma, Berlin) verwendet. Dabei handelt es sich um ein Oligonukleotid, welches spezifisch CCR2/CCL2, aber nicht CCL7 (MCP-3) -vermittelte Reaktionen über CCR2 in der Peripherie hemmt.

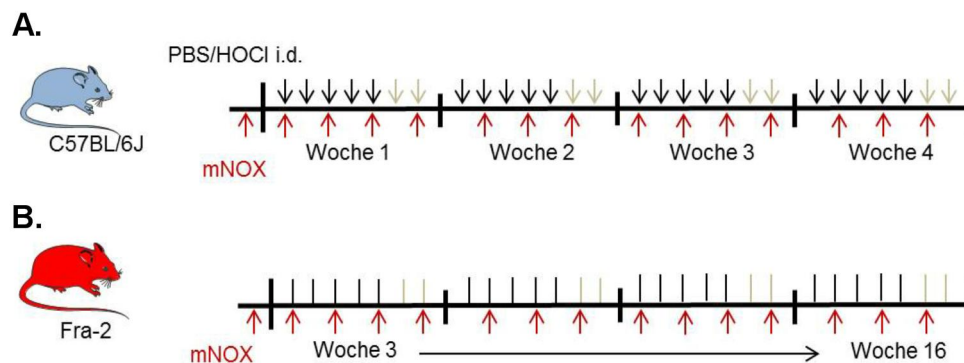


Abbildung 19: Schematische Darstellung zum Injektionsschema im induzierten und spontanen Mausmodell.

(A) C57BL/6J WT Tiere wurden an Tag 0 mit mNOX-E36 intraperitoneal behandelt. Ab Tag 1 wurde die intradermale Injektion mit PBS oder HOCl gestartet und diese von Montag bis Freitag (gesamt 4 Wochen) durchgeführt. Alle zwei Tage wurden die Tiere mit mNOX-E36 behandelt. (B) Fra-2 Tiere wurden nach dem Absetzen in Woche 3 mit mNOX-E36 intraperitoneal von Woche 3 bis Woche 16 alle zwei Tage behandelt.

Die Blockierung von CCR2/CCL2 in der Peripherie wurde wie in Abbildung 19A/B dargestellt im induzierbaren und spontanen Mausmodell durchgeführt. C57BL/6J Wildtyp und Fra-2 Tiere wurden ab Tag 0 alle zwei Tage mit dem Aptamer behandelt. In den WT Tieren wurde ab Tag

1 mit der Fibroseinduktion über HOCl begonnen. In beiden Versuchen wurde eine Kontrollgruppe mitgeführt, der ein inaktives (reversed) Aptamer verabreicht wurde.

### 3.4.1. Durchflusszytometrische Analysen der Haut

Die zelluläre Zusammensetzung in beiden Mausmodellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie nach mNOX-E36 Behandlung untersucht. Hierfür wurden folgende Marker verwendet: CD45, Zombie Nir (Totfarbstoff), TCR, CD19, CD335, CD11b, Ly6C, CD64.

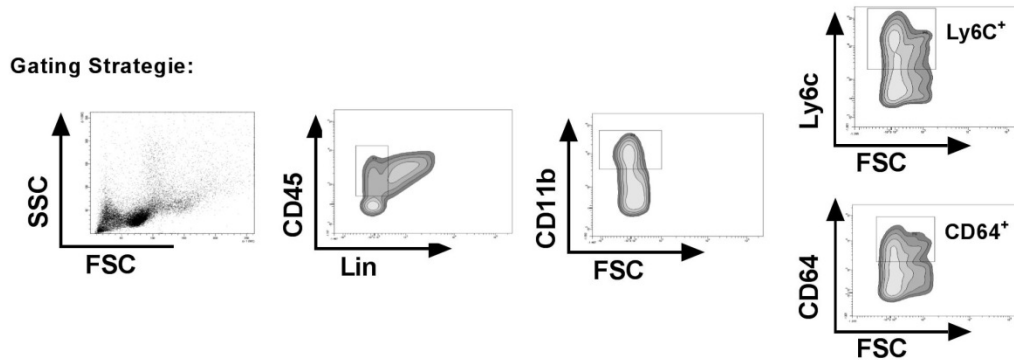


Abbildung 20: Gating strategie nach mNOX-E36 Behandlung.

Dargestellt wird die Gatingstrategie. Zunächst wurde ein Einschluss von Zellen im SSC/FSC vorgenommen, um danach die lebenden CD45<sup>+</sup> Zellen zu betrachten und um zeitgleich T-,B-,NK-Zellen (Lin) auszuschließen. Weiterführend wurden CD11b<sup>+</sup> Zellen eingegrenzt, um dann Ly6C<sup>+</sup> und CD64<sup>+</sup> Zellen zu unterscheiden.

In beiden Modellen der Sklerodermie wurden Hautstanzen enzymatisch verdaut und die gewonnenen Zellen wie in Abbildung 20 beschrieben durchflusszytometrisch analysiert.

#### 3.4.1.1 Durchflusszytometrische Analysen der Haut im induzierten Mausmodell

Nach 28 Tagen wurden die Mäuse aufgearbeitet und die Haut durchflusszytometrisch analysiert. Die Analysen wurden wie in Abbildung 20 durchgeführt.

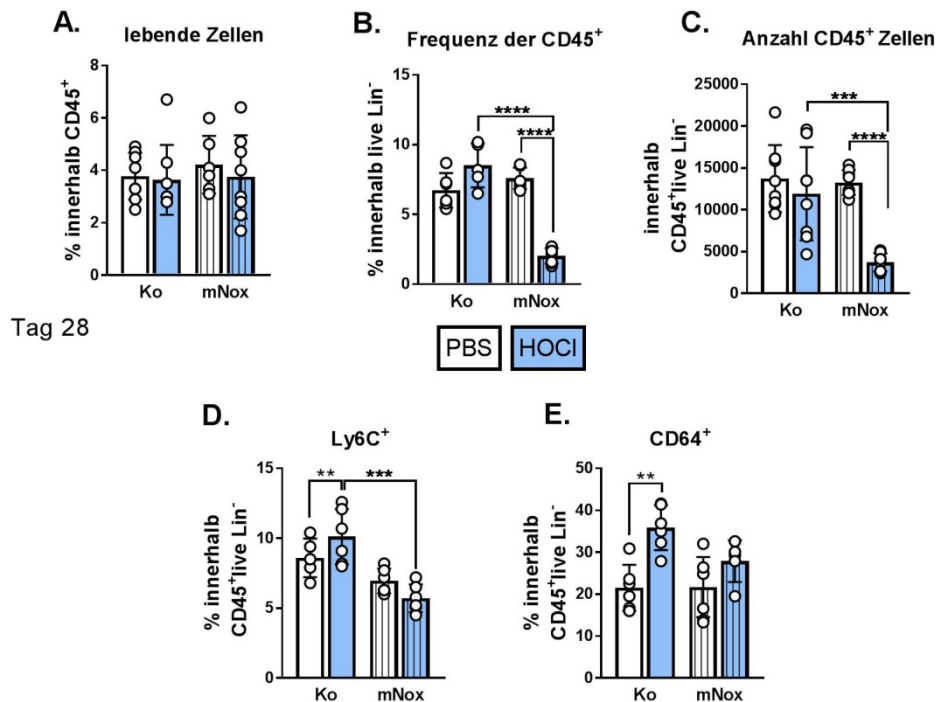


Abbildung 21: Infiltration HOCl behandelter Haut nach mNOX-E36 Behandlung.

Hautstanzen wurden nach vier Wochen enzymatisch aufgearbeitet, gefärbt und wie in Abbildung 20 beschrieben analysiert. (A) Der Graph zeigt die Frequenz der lebenden CD45<sup>+</sup> Zellen nach 28 Tagen HOCl-Behandlung. (B) Dargestellt ist die Frequenz der CD45<sup>+</sup> Zellen innerhalb der Lin<sup>-</sup> lebenden Zellen, sowie die absolute Anzahl (C) der CD45<sup>+</sup> dieser Population. (D) Dargestellt ist die Frequenz der Ly6C<sup>+</sup> Monozyten und (E) CD64<sup>+</sup> Makrophagen innerhalb der CD45<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> lebenden Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit +/- SD. (Ko: Kontrolle; inaktives mNOX-E36), (n=5-6 Mäuse pro Gruppe) (\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 und \*\*\*\*p<0.0001).

Die Frequenz der CD45<sup>+</sup> Zellen war nach HOCl Behandlung im Vergleich zur PBS Kontrolle leicht erhöht (siehe Abb. 21B). Es konnte mit einem Totfarbstoff ausgeschlossen werden, dass die Behandlung mit mNOX-E36 zu einem sterben der Zellen führt (siehe Abb. 21A).

Die absolute Anzahl der CD45<sup>+</sup> Zellen war durch die HOCl-Behandlung an Tag 28 nicht erhöht. Interessanter Weise konnten wir in Tieren, die mit HOCl und dem Aptamer behandelt wurden eine signifikant geringere Frequenz und Anzahl von Immunzellen in der Haut messen (siehe Abb. 21C). Eine genauere Analyse der CD45<sup>+</sup> Immunzellen zeigte, dass vor allem Ly6C<sup>+</sup> Monozyten und CD64<sup>+</sup> Makrophagen in der Haut auf den HOCl Stimulus hin einwanderten, nicht aber wenn die Mäuse parallel mit dem Aptamer behandelt wurden (siehe Abb. 21D/E).

### 3.4.1.2 Durchflusszytometrische Analysen der Haut im spontanen Mausmodell

Um die zelluläre Zusammensetzung und die Differenzierung in der Haut von Fra-2 Mäusen nach peripherer CCR2/CCL2 Blockade mittels mNOX-E36 zu untersuchen, wurden

## Ergebnisse

Hautstanzen mechanisch disruptiert, enzymatisch verdaut, die Zellen gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

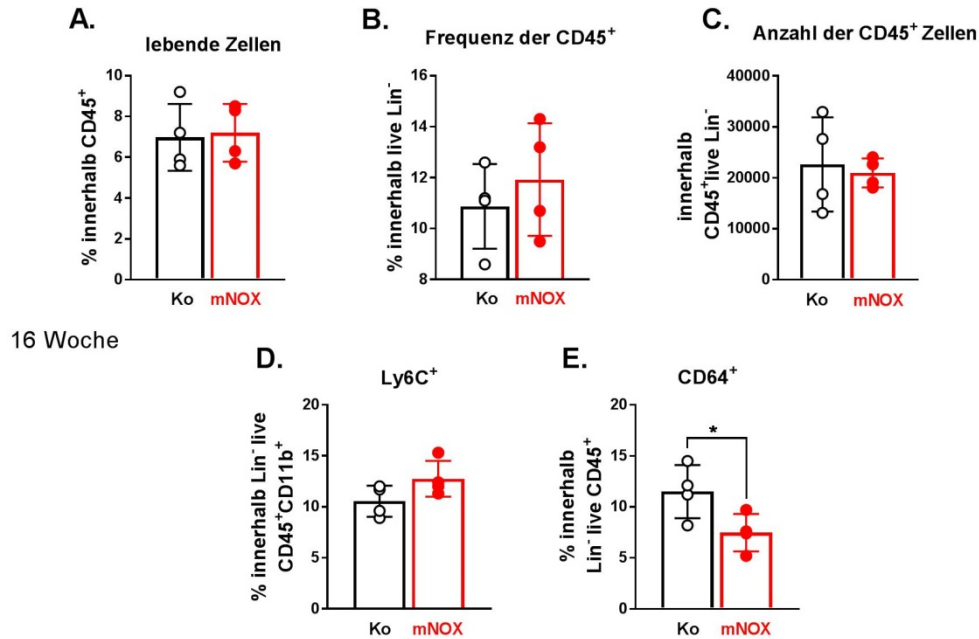


Abbildung 22: Infiltrat-Charakterisierung nach mNOX-E36 Behandlung in der Fra-2 Maus Haut.

(A) Der Graph zeigt die Frequenz der lebenden CD45<sup>+</sup> Zellen nach 16 Wochen. (B) Dargestellt ist die Frequenz der CD45<sup>+</sup> Zellen innerhalb der Lin<sup>-</sup> lebenden Zellen, sowie die absolute Anzahl (C) der CD45<sup>+</sup> dieser Population. (D) Dargestellt ist die Frequenz der Ly6C<sup>+</sup> Monozyten und (E) CD64<sup>+</sup> Makrophagen innerhalb der CD45<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> lebenden Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit +/- SD. (Ko: Kontrolle; inaktives mNOX-E36). (n=4-5 Mäuse pro Gruppe) (\*p<0.05).

Fra-2 Tiere die über 5 Wochen mit mNOX-E36 behandelt wurden zeigten im Vergleich zum inaktiven Aptamer keine Veränderungen in Frequenz und Anzahl CD45<sup>+</sup> Zellen (siehe Abb. 22A/B). Des Weiteren sind keine Unterschiede in der Frequenz Ly6C<sup>+</sup> Monozyten nach CCR2/CCL2 Blockade zu erkennen (siehe Abb. 22C). Die Behandlung der Fra-2 Tiere mit dem Aptamer führte allerdings, verglichen mit inaktiven Aptamer-behandelten Fra-2 Tieren, zu einer signifikanten Reduktion der Frequenz CD64<sup>+</sup> Makrophagen (siehe Abb. 22D).

### 3.4.2. Untersuchung der kutanen Fibroseentwicklung

Ob die Blockierung von CCR2/CCL2 in der Peripherie in beiden Sklerodermiemodellen eine Auswirkung auf die dermale Fibrose hat, wurde im nächsten Abschnitt mit der Kollagenbestimmung in der Haut geprüft. Schnitte wurden in Paraffin eingebettet, geschnitten und gegen Masson-Goldner-Trichrom gefärbt.

### 3.4.2.1 Untersuchung der kutanen Fibroseentwicklung im induzierbaren Mausmodell

Hautstanzen wurden nach vier Wochen entnommen und gegen Masson-Goldner-Trichrom gefärbt, um die Kollagenakkumulation in der Dermis zu bestimmen.

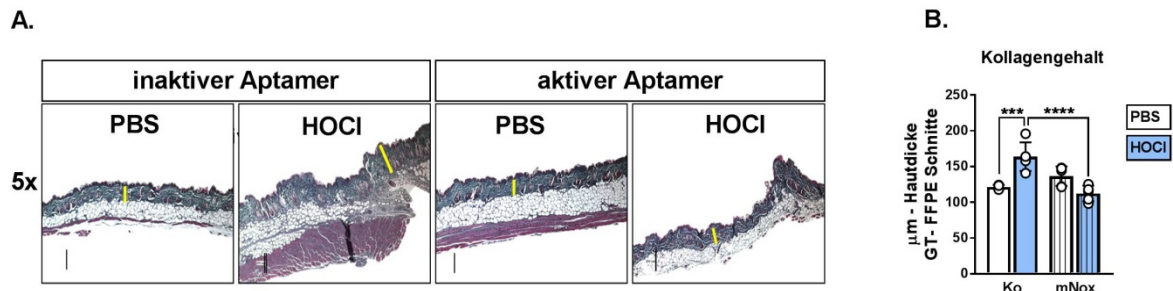


Abbildung 23: Bestimmung des Kollagengehalts der Haut im induzierten Mausmodell nach mNOX Gabe.

Hautstanzen wurden nach vier Wochen histologisch mit einer Masson-Goldner-Trichrom Färbung untersucht. (A) Der Kollagengehalt in der Dermis mittels einer Distanzlinie ermittelt. Auf der linken Seite ist die Behandlung mit der inaktiven Form abgebildet und auf der rechten Seite die Gabe vom aktivem mNOX-E36. Die dargestellten Schnitte stammen repräsentativ aus einem Versuch nach vier Wochen. (B) Der Graph zeigt den Mittelwert mit  $\pm$ -SD. Gezeigt wird die gemessene histologische Hautdicke. (n=6-9 Mäuse pro Gruppe) (\*\*\*)  $p < 0.001$  und \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ). FFPE: Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe

Die Behandlung mit HOCl induziert eine Verdickung der Haut in den Kontrolltieren (inaktives Aptamer). Durch die Behandlung mit dem CCR2/CCL2 spezifischen Aptamer konnte die Wirkung von HOCl aufgehoben werden. Die Aptamer-Behandlung blockierte vollständig eine Fibroseentwicklung in der Haut (siehe Abb. 23A/B).

### 3.4.2.2 Untersuchung der kutanen Fibroseentwicklung im spontanen Mausmodell

Die Kollagenakkumulation wurde nach 16 Wochen mNOX-E36 Behandlung im spontanen Fra-2 Mausmodell untersucht.

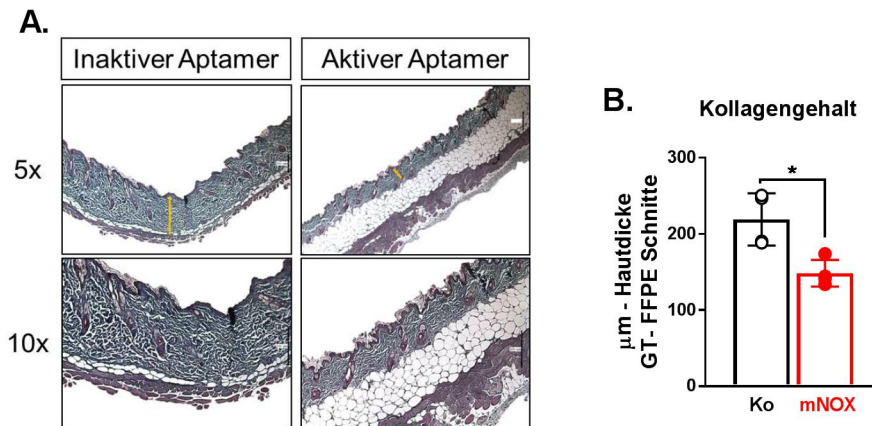


Abbildung 24: Bestimmung des Kollagengehalts in Fra-2 Haut nach mNOX-E36 Behandlung.

Hautstanzen wurden nach 5 und 16 Wochen histologisch mit einer Masson-Goldner-Trichrom Färbung untersucht. (A) Der Kollagengehalt in der Dermis mittels einer Distanzlinie ermittelt. Auf der linken Seite sind Wildtyp (WT) Mäuse abgebildet und auf der rechten Seite die Fra-2 Tiere. Die dargestellten Schnitte stammen repräsentativ aus einem Versuch nach 5 Wochen und 16 Wochen. (B) Der Graph zeigt den Mittelwert mit +/-SD. Gezeigt wird die gemessene histologische Hautdicke. (n=4-5 Mäuse pro Gruppe) (\*p<0.05). FFPE: Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe

Fra-2 Haut in Woche 16 zeigte eine Dermisdicke von ca 200µm. Durch die Behandlung mit dem CCR2/CCL2 spezifischen Aptamer konnte die spontane Hautverdickung und die damit verbundenen Kollagenakkumulation in Fra-2 Tieren signifikant reduziert werden. Ebenso konnte durch die Behandlung mit dem spezifischen CCR2/CCL2 Aptamer die Lungenfibrose reduziert werden (Daten nicht gezeigt).

### 3.5. Die Funktion der Milz als Reservoir monozytärer Zellen für die dermale Fibrose

Die vorherigen Ergebnisse zeigen deutlich einen Einfluss monozytärer Zellen auf die dermale Fibrose. Ebenso deuten sie darauf hin, dass hautinfiltrierende Monozyten in der Sklerodermie aus der gesamten Peripherie rekrutiert werden und nicht wie zuvor in Studien anderer Arbeitsgruppen beschrieben vorrangig aus dem Knochenmark. Diese Annahme belegt sich mit der Tatsache, dass CCR2 KO Mäuse, die eine deutlich verminderten Monozytenegress aus dem Knochenmark über CCR2 in die Blutbahn zeigen, eine dermale Fibrose entwickeln. Die Blockierung von CCR2 in der Peripherie mittels mNOX-E36 resultierte in einer verminderten Fibrose, was nun die Frage aufwirft, aus welchem Reservoir wandern die monozytären Zellen in das entzündliche Gewebe ein? Die Milz ist seit längerem als wichtiges Reservoir für Monozyten bekannt. Daher wurden splenektomierte Mäuse mit HOCl behandelt, um eine dermale Fibrose zu induzieren.

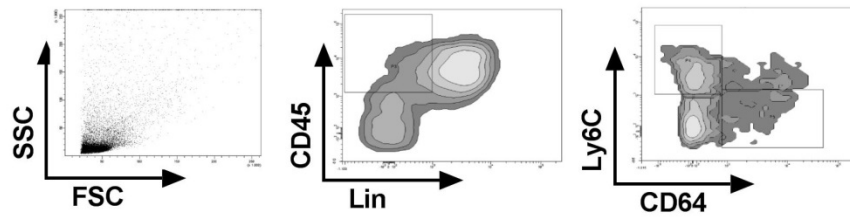
#### 3.5.1. Durchflusszytometrische Analysen der dermalen Infiltration

Von Jackson Laboratories splenektomierte Mäuse und entsprechenden C57BL/6J Kontrolltiere mit Milz wurden vier Wochen mit HOCl/PBS behandelt. Hautstanzen wurden

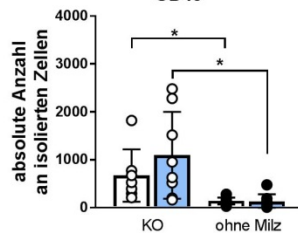
## Ergebnisse

entnommen, enzymatisch verdaut und durchflusszytometrisch auf folgende Marker untersucht: CD45, Zombie Nir (Totfarbstoff), CD11b, TCR, CD19, CD335, Ly6C und CD64.

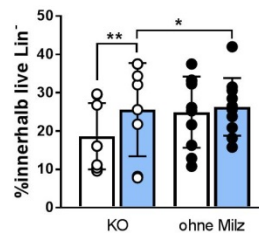
### A. Gating Strategie: Bsp Haut



### B. absolute Zellzahl CD45<sup>+</sup>

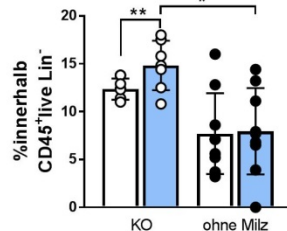


### C. CD45<sup>+</sup>



PBS HOCl

### D. Ly6C<sup>+</sup>



### E. CD64<sup>+</sup>

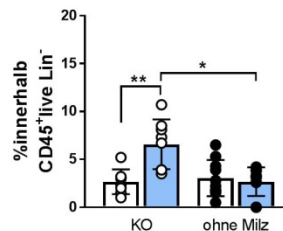


Abbildung 25: Durchflusszytometrische Analyse des dermalen Infiltrats in splenektomierten Mäusen.

(A) Dargestellt wird beispielhaft die Gatingstrategie der Hautproben. Zunächst wurde ein Einschuss von Zellen im SSC/FSC vorgenommen, anschließend ein Doubletten Ausschluss (hier nicht gezeigt), um danach die lebenden CD45<sup>+</sup> Zellen, die TCR-beta, CD19 und NKp46-(Lin) nicht exprimieren. Innerhalb dieser Zellen wurden die Ly6C/CD64 Zellen eingeschlossen. (B) Dargestellt ist die absolute Zellzahl der isolierten Zellen. (C) Der Graph zeigt den prozentualen Anteil an CD45<sup>+</sup> Zellen innerhalb der Lin<sup>-</sup> Zellen. (D) Die Mittelwerte der Ly6C<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD45<sup>+</sup> Zellen ist als prozentualer Anteil dargestellt. (E) Dargestellt ist die Frequenz der CD64<sup>+</sup> Zellen nach 28 Tagen in der Haut. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SD. (KO: Kontrolle, C57BL/6J Mäuse mit Milz) (n=6-9 Mäuse pro Gruppe) (\*p<0.05, \*\* p<0.01).

Die Behandlung mit HOCl führt in Tieren mit intakter Milz zu einem Influx von CD45<sup>+</sup> Zellen, sowohl im Hinblick auf die absolute Zellzahl (siehe Abb. 25B/) als auch auf die Frequenz der Zellen (siehe Abb. 25C). Aus den Hautproben der splenektomierten Tiere konnte nach vierwöchiger Behandlung mit HOCl kaum CD45<sup>+</sup> Immunzellen isoliert werden (siehe Abb. 25B). Wir konnten in den splenektomierten Hautproben zudem keine Erhöhung der Frequenz CD45<sup>+</sup> Zellen durch HOCl feststellen. Wie zu erwarten, wurden in HOCl-behandelten WT Tieren vor allem Ly6C<sup>+</sup> Monozyten und CD64<sup>+</sup> Makrophagen in der Haut nachgewiesen. Die

Haut splenektomierter Tiere zeigte keinen HOCl-abhängigen Influx Ly6C<sup>+</sup> oder CD64<sup>+</sup> Zellen (siehe Abb. 25D/E). Wir konnten somit, in Mäusen ohne Milzreservoir kaum Rekrutierung von Ly6C<sup>+</sup> entzündlichen Monozyten in die Haut messen und zudem weniger HOCl-abhängige Differenzierung in CD64<sup>+</sup> Makrophagen in der Läsion nachweisen (siehe Abb. 25E).

### 3.5.2. Histologische Bestimmung des Kollagengehalts

Die Masson – Goldner-Trichrom Färbung gibt Auskunft darüber, ob sich der HOCl-induzierte Kollagengehalt in der Dermis bei Mäusen mit und ohne Milz unterscheidet. Hautstanzen wurden nach vier Wochen entnommen und in Paraffin eingebettet. Schnitte wurden gefärbt und später mikroskopisch untersucht und vermessen.

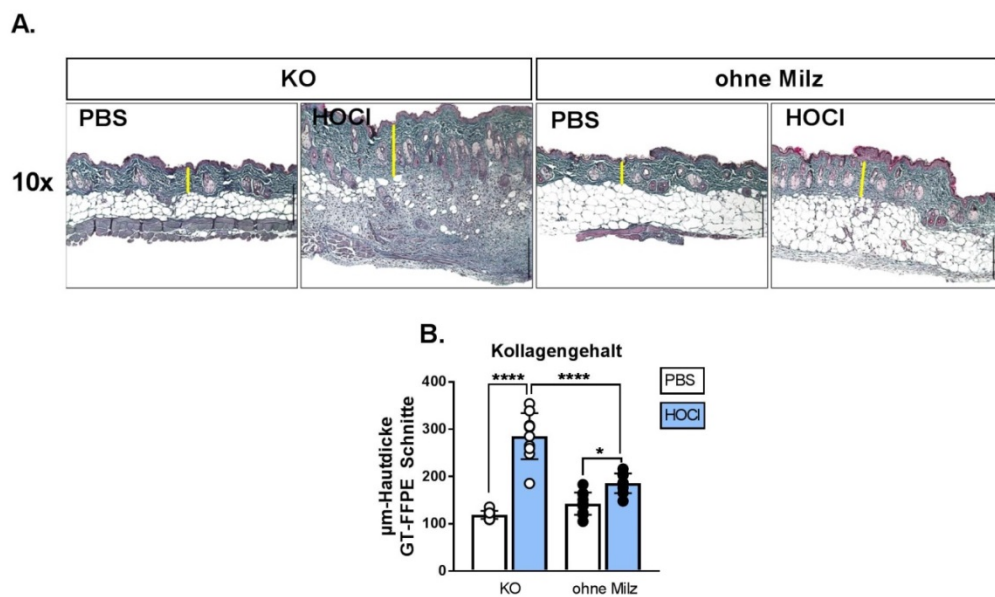


Abbildung 26: Bestimmung des Kollagengehalts in splenektomierten Mäusen.

Nach Vier Wochen wurden Hautstanzen histologisch mit einer Masson-Goldner-Trichrom Färbung untersucht. (A) Der Kollagengehalt in der Dermis mittels einer Distanzlinie ermittelt. Die dargestellten Schnitte stammen repräsentativ aus einem Versuch. Der Graph zeigt Mittelwerte +/- SD von einem Experiment mit je 6-9 Tieren, Kalibrierungsbalken spannen 200µm (\*p<0.05, \*\*\*\* p<0.0001). FFPE: Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe

Histologische Präparate von WT Tieren mit Milz zeigen eine signifikante Zunahme der Hautdicke nach 28 Tagen Behandlung mit HOCl. In splenektomierten Mäuse führt die i.d. HOCl Applikation zu einer signifikant geringeren dermalen Kollagenakkumulation im Vergleich zur HOCl-Kontrollgruppe. Allerdings ist auch in den splenektomierten Tiere eine Behandlung mit HOCl in der Lage, eine Kollagenakkumulation zu induzieren (siehe Abb. 26A/B). Die Entfernung des Milz-Reservoirs in C57BL/6J wirkt also partiell reduzierend auf die Ausbildung einer Hautfibrose durch HOCl.

### **3.6. Regulatorische T-Zellen in der dermalen Fibrose**

Für diverse Autoimmunerkrankheiten, wie zum Beispiel IPEX (Immundysregulation-Polyendokrinopathie-Enteropathie-X-chromosomal), wurde eine Dysfunktionalität von regulatorischen T-Zellen beschrieben. Das Fehlen eines Treg spezifischen Markers im humanen System macht die Forschung zur Rolle von Tregs in SSc schwierig, da Foxp3 von verschiedenen Zelltypen exprimiert werden kann. In Mäusen haben wir über den Transkriptionsfaktor Foxp3 die Möglichkeit Tregs spezifisch nachzuweisen. Tregs könnten in der Modulation der Mechanismen der angeborenen Immunantwort die SSc Entwicklung mit beeinflussen. Wir haben uns die Frage gestellt, ob im Verlauf der SSc-Entwicklung in Fra-2 Mäusen und im induzierbaren Mausmodell Unterschiede im T-Zell Kompartiment bzw. in der Treg-Population auftreten.

#### **3.6.1. T-Zell-Diversität in fibrotischer Haut**

CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zeigen bei Autoimmunerkrankungen eine hohe Plastizität in Abhängigkeit vom umgebenden Zytokinmilieu und von zellulären Stimulationsfaktoren. Um das T-Zellkompartiment in fibrotischer Haut näher zu charakterisieren, wurden Hautstanzen aus Wildtyp und Fra-2 Mäusen in Woche 3, 5, 9, 12 und 16 gewonnen und enzymatisch verdaut. Ebenso wurden Wildtypmäuse für eine Woche, zwei Wochen und vier Wochen mit HOCl behandelt und die Rückenhaut auf ihre CD4<sup>+</sup>-Zusammensetzung untersucht.

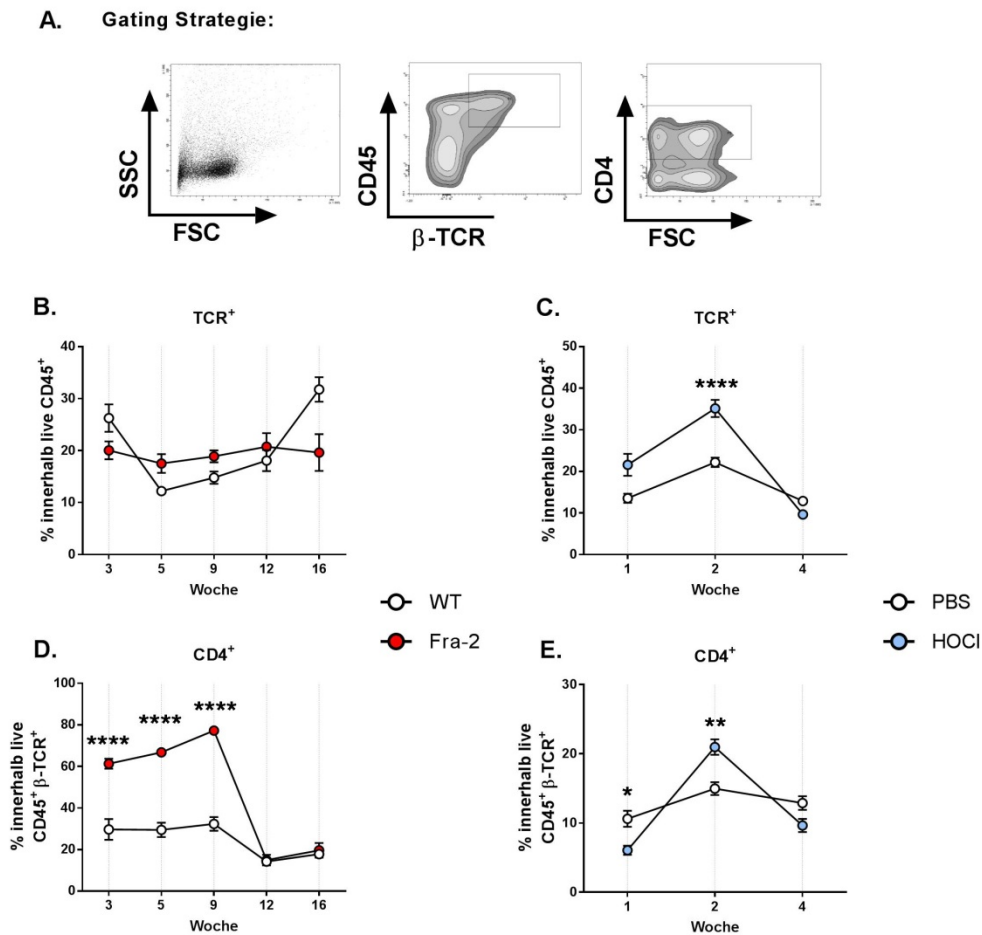


Abbildung 27: Durchflusszytometrische Untersuchungen der T-Zellen im spontanen und induzierten Mausmodell.

(A) Dargestellt ist Gatingstrategie für CD4<sup>+</sup>T-Zellen und TCR<sup>+</sup>-Zellen. Zunächst wurde ein Einschluss von Zellen im SSC/FSC vorgenommen, anschließend wurden die CD45<sup>+</sup>TCR<sup>+</sup> Zellen eingeschlossen, um dann die CD4<sup>+</sup> Zellen betrachten zu können. (B) Dargestellt ist der prozentuale Anteil von TCR<sup>+</sup>-Zellen in der Kinetik von Fra-2 Tieren. (C) Die Mittelwerte der TCR<sup>+</sup>-Zellen innerhalb der CD45<sup>+</sup> Zellen ist als prozentualer Anteil nach HOCl Behandlung dargestellt. (D/E) Die Graphen stellen den prozentualen Anteil von CD4<sup>+</sup> Zellen im Fra-2 und HOCl-Mausmodell dar. Der Graph zeigt Mittelwerte +/- SD von zwei separaten Versuchen mit je 6-9 Tieren (\*p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\*\* p<0.0001).

Hautstanzen der Fra-2 Linie zeigen bereits nach dem Absetzen einen signifikant höheren Anteil CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu WT-Tieren. Der Anteil der CD4<sup>+</sup> Zellen nimmt bis Woche 9 stetig zu und fällt dann mit Einsetzen des fibrotischen Stadiums in Woche 12 bis zum Fibroseendstadium in Woche 16 ab (siehe Abb. 27B).

Auch Hautstanzen von Mäusen, die 2 Wochen mit HOCl behandelt wurden zeigen eine Zunahme der CD4<sup>+</sup> T-Zellfrequenz in läsionaler Haut, die in Woche 4 mit Einsetzen der Fibrose zurückgeht (siehe Abb. 27C).

Die T-Zellantwort in beiden Modellen erreicht ihren Höhepunkt in der entzündlichen Phase und flaut mit Erreichen des fibrotischen Stadiums wieder ab.

### 3.6.2. Regulatorische T-Zellen in induzierter und sich spontan-entwickelnder Haut-Fibrose

Regulatorische T-Zellen (Tregs) sind ein wichtiger Schutz vor überschießenden Immunantworten bei Autoimmunität. Zur Treg-Frequenz in Patienten gibt es bislang nur unzureichende Studienbelege. Im Mausmodell wurde die Rolle von Treg in der dermalen Fibrose bislang nicht adressiert.

Daher haben wir im nächsten Kapitel die Frequenz von Tregs im spontanen und induzierbaren Mausmodell mittels Durchflusszytometrie isolierter Hautzellen bestimmt.

Tregs werden im Maussystem als  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  Zellen charakterisiert (siehe Abb. 28A).

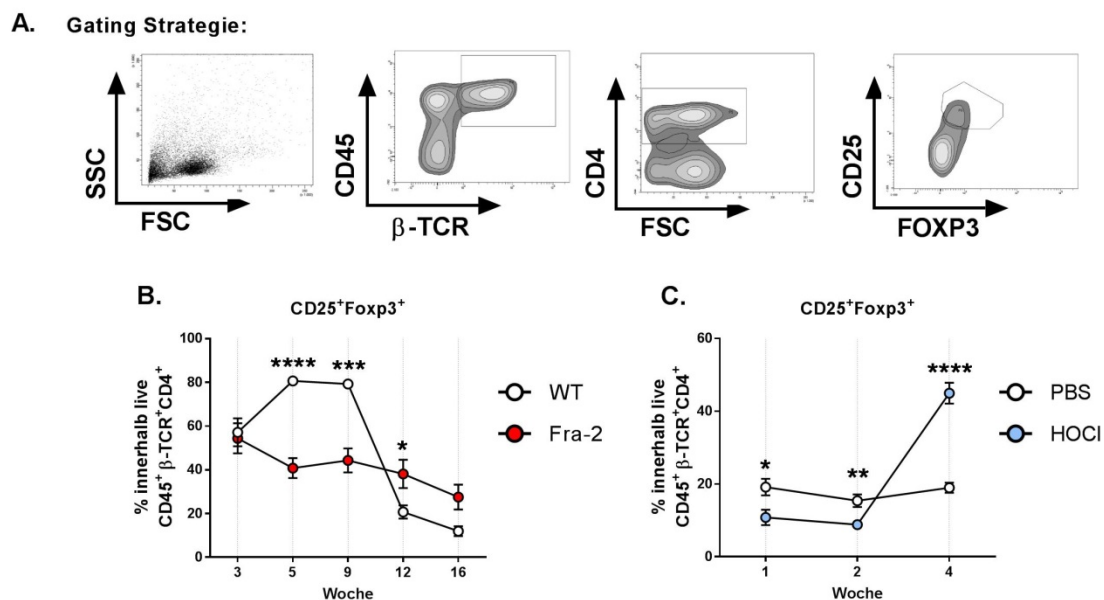


Abbildung 28: Durchflusszytometrische Analysen von Tregs in der Rückenhaut.

(A) Dargestellt ist Gatingstrategie um  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  Tregs zu quantifizieren. Zunächst wurde ein Einschluss von Zellen im SSC/FSC vorgenommen, anschließend wurden die  $CD45^+TCR^+$  Zellen eingeschlossen, um dann die  $CD4^+$  Zellen auf die Expression von  $CD25^+$  und  $Foxp3^+$  hinzu untersuchen (B) Dargestellt ist die Frequenz der  $CD25^+Foxp3^+$  Zellen innerhalb der  $CD4^+$  T-Zellen in Fra-2 Tieren unterschiedlichen Alters. (C) Die Mittelwerte der  $CD25^+Foxp3^+$  Zellen innerhalb der  $CD45^+TCR^+CD4^+$  Zellen sind als prozentualer Anteil nach HOCl-Behandlung dargestellt. Der Graph zeigt Mittelwerte +/- SD von zwei separaten Versuchen mit je 6-9 Tieren (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  und \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

Direkt nach dem Absetzen der Fra-2 Tiere in Lebenswoche 3 ist kein Unterschied in der Frequenz der  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  Treg in der Haut zu erkennen. Ab Lebenswoche (LW) 5 bis LW 9 ist der prozentuale Anteil der Tregs in der Fra-2 Maus verglichen zur Wildtypmaus signifikant vermindert. Die Frequenz von Tregs im CD4-Kompartiment mit Einsetzen des fibrotischen Stadium in LW 12 ist signifikant erhöht im Vergleich zum WT. Fra-2 Tiere zeigen Alters- und damit Krankheitsabhängig mit zunehmender Schwere der Fibrose eine Zunahme der Treg-Frequenzen (siehe Abb. 28B). Ein ähnliches Bild zeigt sich im HOCl-induzierten Mausmodell. Hier finden wir in Woche 1-2 der HOCl Behandlung signifikant reduzierte Treg-Frequenzen in der Haut, die sich in der fibrotischen Läsion am Ende der Woche 4 jedoch

komplett umkehren. In beiden Modellen kommt es nach anfänglicher Treg Reduktion während der entzündlichen Phase zu einer Kompensation gekennzeichnet durch eine Verdopplung der Treg-Frequenz in der fibrotischen Phase verglichen mit der entsprechenden Kontrollgruppe. (siehe Abb. 28C).

### **3.7. Monozytenzusammensetzung im Vollblut von Sklerodermiepatienten**

Die Ergebnisse dieser Arbeit und veröffentlichte Studien zeigen, dass Monozyten in der Frühphase der Erkrankung eine entscheidende Rolle spielen. Auch in Patienten konnte man in läsionaler Haut von Sklerodermiepatienten zelluläre Infiltrate messen. Wir konnten zeigen, dass die periphere Blockade der Monozytenrekrutierung in die Haut über den CCR2/CCL2 Signalweg die Fibrose reduzieren kann. Die Frequenz von Monozyten in der Zirkulation ist also vermutlich mit der Schwere der Fibrose korreliert.

Es gibt bislang jedoch nur wenige Charakterisierungen der zirkulierenden Monozytensubpopulationen in Patienten. Daher haben wir im nächsten Kapitel die zirkulierenden Monozytenpopulationen im Blut der Sklerodermiepatienten sowie die Zellen gesunder Spender untersucht.

#### **3.7.1. Studiendesign**

20 Patienten mit systemischer Sklerodermie und 5 gesunde Kontrollen wurden für die Charakterisierung von zirkulierenden Monozyten im Vollblut eingeschlossen. Zur Standardisierung des Krankheitsverlaufs wurden entsprechende klinische Scores (Rodnan skin score, ACR-Kriterien [Sklerodermie] verwendet. Den eingeschlossenen Patienten wurden 1x120ml Vollblut entnommen und die Monozytenzusammensetzung im Blut untersucht. Die Blutentnahme erfolgte auf freiwilliger Basis und wurde bei den Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung oder bei niedrig dosierten systemischen Therapien durchgeführt.

Die Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz hat der Durchführung der Untersuchungen zugestimmt.

#### **3.7.2. Charakterisierung der Patienten- und Probandenkohorte**

Im Rahmen dieser Studie wurden von März 2018 bis September 2019 insgesamt 20 Sklerodermiepatienten eingeschlossen. Das Alter wurde als Mittelwert mit Standardabweichung berechnet (Frau: 60,31±14,20 Mann: 69,5±5,19). Einschlusskriterien waren eine diagnostisch gesicherte systemische Sklerodermie sowie ein Alter der Patienten über 18 Jahre. Es wurden Patienten mit der diffusen kutanen und limitierten kutanen Sklerodermie eingeschlossen. Genauere Angaben über Anzahl, Geschlecht, Alter und Grund-Diagnose sind in der Tabelle 1 zu entnehmen.

|   | <b>Weiblich</b>          | <b>Männlich</b> | <b>Medikamente</b>   |
|---|--------------------------|-----------------|--|
| Anzahl Patienten                                | 18                       | 2               | keine  |
| Alter (Mittelwert+SD)                           | 60,31±14,20              | 69,5±5,19       | keine  |
| Systemische Sklerodermie                        | 11                       | 2               | Diltiazemsalbe, Azathropin, Predisolon, Quensyl, Adalat, Ilomedin, MTX, CellCept |
| CREST-syndrome (limitierte kutane Sklerodermie) | 5                        | 0               | Predisolon, Quensyl, CellCept, MMF   |
| diffuse kutane Sklerodermie                     | 6                        | 2               | Azathropin, Predisolon, Quensyl, Adalat, Ilomedin, MTX, CellCept,                |
| Akren   | Raynaud-Syndrom          | 16              | keine  |
|   | Sklerodactylie           | 7               | keine  |
|   | Digitale Ulzerationen    | 12              | keine  |
|   | Madonnenfinger           | 1               | keine  |
| Fazial  | Mikrostomie              | 8               | keine  |
|   | Frenulumsklerose         | 2               | keine  |
|   | sklerodermatische Amimie | 4               | keine  |
|   | Verschmälerung Lippenrot | 5               | keine  |
|   | Teleangiektasien         | 10              | keine  |
|   | Calcinosis cutis         | 2               | keine  |

Des Weiteren wurden Anamnesebögen zur Bestimmung von klinischen Symptomen und systemischer Beteiligung angefertigt.

Tabelle 2: Klinische Symptome und Systemische Beteiligung.

| Klinische Symptome                           | Anzahl | Systemische Beteiligung         | Anzahl |
|--|--------|---------------------------------|--------|
| Hautverdickung beider Hände                  | 9      | Pulmonale arterielle Hypertonie | 3      |
| Geschwollene Finger ( <i>Puffy fingers</i> ) | 10     | Sklerodermie relevante AK       | 3      |
| Madonnenfinger                               | 1      |                                 |        |
| Rattenbissnekrosen                           | 3      |                                 |        |
| Rattenbissnekrosen(Narbenbildung)            | 5      |                                 |        |
| Teleangiektasien                             | 8      |                                 |        |
| Raynaud Phänomen                             | 15     |                                 |        |

Insgesamt wurden 5 gesunden Spendern Blut entnommen und deren Werte mit denen der Sklerodermiepatienten verglichen.

In Tabelle 6 sind Alter und Geschlechtsverteilung zu erkennen.

Tabelle 3: Charakterisierung von gesunden Spendern.

| Gesunde Kontrollen    | Weiblich | Männlich | Gesamt    |
|-----------------------|----------|----------|-----------|
| Anzahl                | 2        | 3        | 5         |
| Alter (Mittelwert+SD) | 32±4,62  | 28±3,57  | 29,6±4,30 |

Als Ausschlusskriterien galten andere schwerwiegende Grunderkrankungen, insbesondere andere Autoimmunerkrankungen, Gerinnungsstörungen oder eine bestehende Antikoagulationstherapie (z.B. Marcumar). Ebenso ausgeschlossen wurden schwangere und stillende Probandinnen und Probanden, bei denen Zweifel an der Einsichtsfähigkeit bestand.

### 3.7.3. Durchflusszytometrische Analysen zirkulierender Monozyten in Blut

Derzeit publizierte Daten demonstrieren kontroverse Daten bezüglich klassischer CD14<sup>+</sup> und patrollierender (nicht-klassischer) CD16<sup>+</sup> Monozyten in Vollblut von Patienten mit systemischer Sklerodermie. Im Jahre 1989 wurden zum ersten Mal die klassischen CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten von Passlick et al. beschrieben <sup>70</sup>. Dabei handelt es sich um die größte Monozytenpopulation

mit circa 80-90% im zirkulierenden Blut. Die Charakterisierung der klassischen Monozyten (dargestellt als Mono 1) erfolgte wie in Abbildung: 29A über folgende Expressionsmarker: CD163, CD14, TREM1, CSF3R. Die nicht-klassischen CD14<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten machen circa 2-10% im peripheren Blut aus. Sie wurden in Abbildung 30A als Mono2 beschrieben und wurden neben CD16 mit Siglec10 und CSFR1 charakterisiert. Des Weiteren wurde in Publikationen eine Monozytenpopulation beschrieben, die sich von ihren Expressionsmustern zwischen den klassischen und nicht-klassischen Monozyten bewegt. Die CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten machen eine Gesamtheit von 2-5% im Vollblut aus.

Villani et al. hat 2017 mit einer detaillierten SingleCell-RNA-Analyse neben den drei Monozytenpopulation noch zwei weitere Monozytensubpopulationen charakterisieren können. In Abbildung 29A sind diese von Villani et al. als Mono3 und Mono4 benannten Populationen aufgeführt. Mono3 exprimiert die Marker MXD1, CXCR1, CXCR2 und VNN2. Das Expressionsmuster von Mono 4 wurde mit PRF1, GNLY und CTSW beschrieben.

Im Blut von Sklerodermiepatienten und Kontrollgruppen wurde zunächst zwischen den klassischen CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> (Mono1), patrollierenden (nicht-klassischen) CD14<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> (Mono2) und den pro-inflammatorischen CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten unterschieden.

## Charakterisierung von Monozyten in Sklerodermiepatienten

A.

### Monozyten Färbung

| Mono 1 | Mono 2   | Mono 3 | Mono 4 |  |
|--------|----------|--------|--------|--|
| CD163  | SIGLEC10 | MXD1   | PRF1   | CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> klassische Monozyten (Mono 1)                        |
| CD14   | CSF1R    | CXCR1  | GNLY   | CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> pro-inflammatorische Monozyten (Mono 3/4)            |
| CD36   |          | CXCR2  | CTSW   | CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> patrollierende (nicht-klassische) Monozyten (Mono 2) |
| TREM1  |          | VNN2   |        |  |
| CSF3R  |          |        |        |  |

B. Gating Strategie:

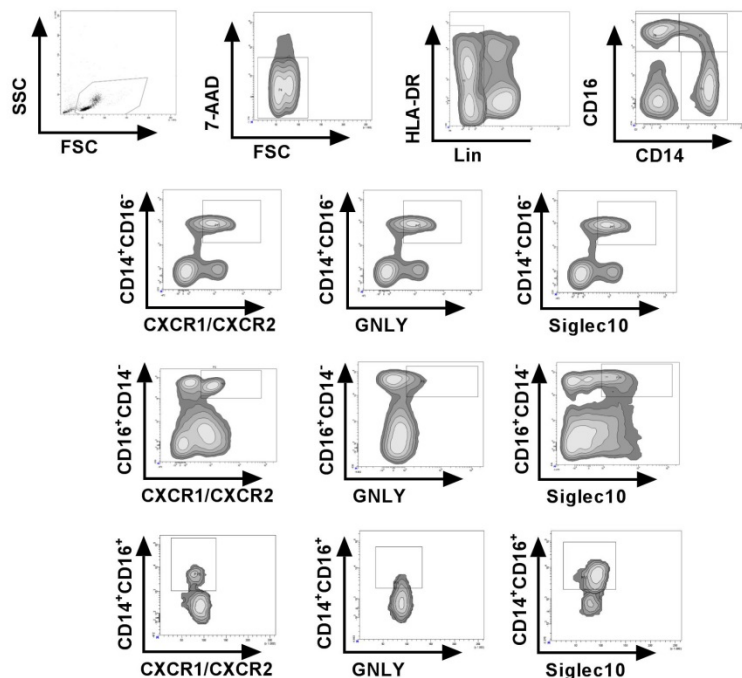


Abbildung 29: Durchflusszytometrische Analysen von Monozyten im Vollblut.

(A) Dargestellt ist die Isolation von PBMCs und dessen Charakterisierung in Mono1, Mono2, Mono3 und Mono4. Dabei werden zunächst die CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> klassischen Monozyten, die CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> pro-inflammatorischen Monozyten und die CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> nicht klassischen Monozyten differenziert. (B) Dargestellt ist Gatingstrategie für die unterschiedlichen Monozytenpopulationen. Zunächst wurde ein Einschluss von Zellen im SSC/FSC vorgenommen, anschließend wurden die HLA-DR<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> Zellen eingeschlossen, um dann die CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Zellen betrachten zu können. Weiterführend wurden CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> Zellen auf ihre Expression von CXCR1/CXCR2, Granulysin und Siglec10 untersucht. Ebenso wurden die CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Zellen auf die Expression von CXCR1/CXCR2, Granulysin und Siglec10 hin untersucht. Innerhalb der CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Zellen wurde schließlich auf die Expression von CXCR1/CXCR2, Granulysin und Siglec 10 bestimmt. (TREM1: *Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cells 1*, CSF3R: *Colony Stimulating Factor 3 Receptor*, CSF1R: *Colony Stimulating Factor 1 Receptor*, MXD1: *MAX Dimerization Protein 1*, CXCR1: *C-X-C Motif Chemokine Receptor 1*, CXCR2: *C-X-C Motif Chemokine Receptor 2*, VNN2: *Vanin 2*, PRF1: *Perforin 1*, GNLY: *Granulysin*, CTSW: *Cathepsin W*)

In Abbildung 29B wurde mittels 7AAD die toten Zellen aus der Analyse ausgeschlossen. HLA-DR positive Zellen, unter Ausschluss der Lineage-Marker CD56, CD19 und TCR wurden auf CD16 und CD14 untersucht. Jede einzelne Population wurde in den weiteren Schritten auf ihre CXCR1/CXCR2, Granulysin und Siglec10 Expression analysiert.

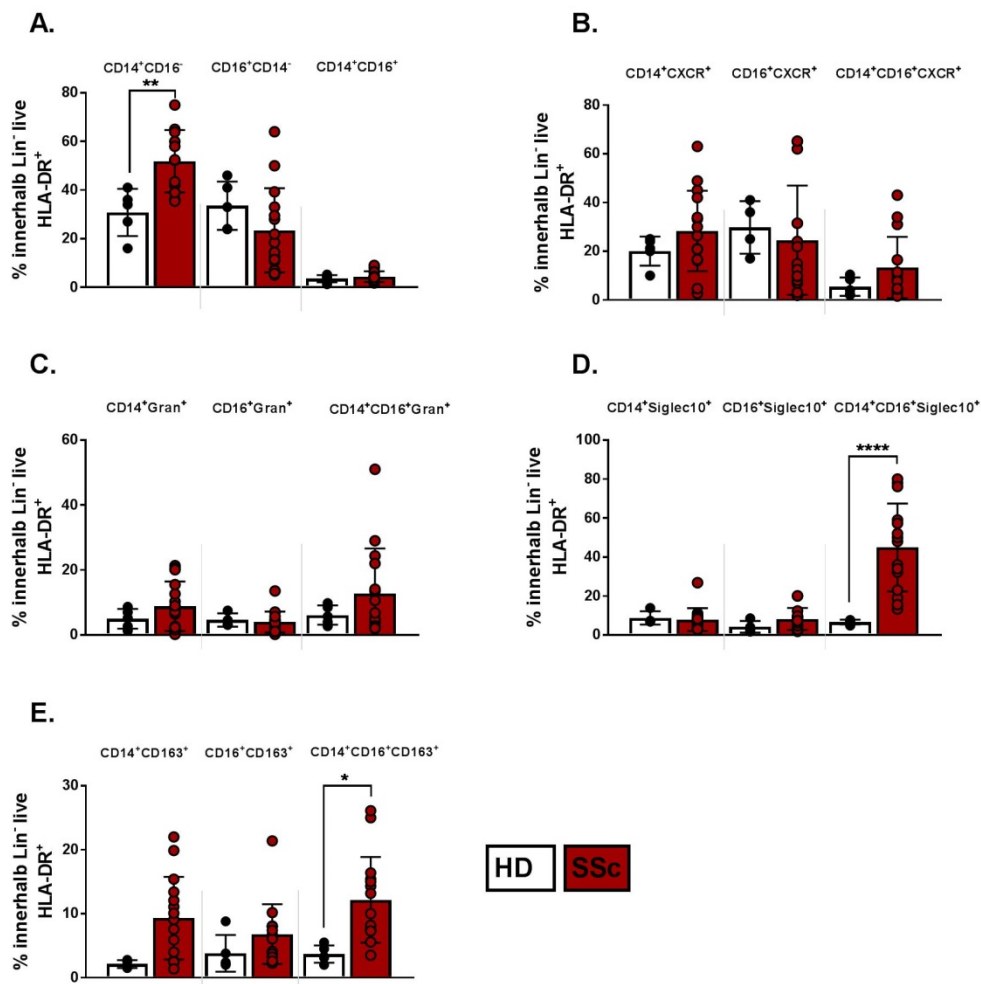


Abbildung 30: Durchflusszytometrische Analysen im Vollblut von SSc-Patienten und gesunden Spendern.

Dargestellt sind die durchflusszytometrischen Analysen von PBMCs aus Sklerodermiepatienten und gesunde Probanden. (A) Dargestellt sind die Mittelwerte mit entsprechender Standardabweichung der CD14<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> und CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten. (B) Der Graph stellt die Expression von CXCR innerhalb der CD14<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> und CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten dar. (C) Dargestellt ist die Expression von Granulysin innerhalb der CD14<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> und CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten. (D) Der Graph zeigt ist die Expression von Siglec10 innerhalb der CD14<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> und CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten. (D) Die Expression von CD163 innerhalb der CD14<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> und CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten ist als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. (CXCR1: C-X-C Motif Chemokine Receptor 1, CXCR2: C-X-C Motif Chemokine Receptor 2, GNLY: Granulysin). Dargestellt sind die Mittelwerte mit entsprechenden Standardabweichungen. (HD: Healthy Donor; SSC: Systemische Sklerodermie). (\*p<0.05, \*\* p<0.01 \*\*\*\* p<0.0001).

Die prozentuale Verteilung von Monozyten innerhalb von Patienten mit Sklerodermie ist aufgrund der unterschiedlichen Schwere der Erkrankung sehr heterogen. Jedoch lässt sich ein leichter Anstieg von CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> klassischen Monozyten von 25% in gesunden Spendern auf 50% in Sklerodermiepatienten nachweisen (siehe Abb. 30A). In Abbildung 30B wurden für die einzelnen Monozytenpopulationen die Expression der Chemokinrezeptoren CXCR1 und CXCR2 untersucht. Die Expression von CXCR1/CXCR2 ist innerhalb den klassischen und

nicht-klassischen Monozyten in den gesunden Spendern und Sklerodermiepatienten nicht signifikant unterschiedlich.

Die pro-inflammatorischen CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CXCR<sup>+</sup> Monozyten sind in den SSc Patienten leicht zur gesunden Spendern erhöht (siehe Abb. 30B). Des Weiteren ist die Granulysin-Expression innerhalb der pro-inflammatorischen Monozyten in den SSC Patienten leicht erhöht (siehe Abb. 30C). Siglec 10, ein Sialsäure-bindendes Ig-ähnliches Lectin 10, ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie und wirkt als inhibitorischer Rezeptor. Siglec 10<sup>+</sup> ist innerhalb der pro-inflammatorischen Monozyten in den Sklerodermiepatienten signifikant zu den gesunden Spendern erhöht (siehe Abb. 31D). Die CD163 Expression ist innerhalb der klassischen CD14<sup>+</sup> Monozyten (Mono 1) und der proinflammatorischen CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten (Mono 2) in den Sklerodermiepatienten signifikant erhöht verglichen zur gesunden Kontrolle (siehe Abb. 30E).

### 3.7.4. Korrelationsanalysen

Die durchflusszytometrischen Analysen der Monozytensubpopulationen wurde im Weiteren mit den individuellen Symptomen als Schweregrad der systemischen Sklerodermie korreliert.

Die Symptome setzen sich ausfolgenden Kriterien zusammen:

Tabelle 4: Kriterien der systemischen Sklerodermie.

| Kriterien                                       | Schwere (Bewertung) |
|---|---------------------|
| Hautverdickung der Hände                        | 9                   |
| Geschwollene Finger ( <i>Puffy fingers</i> )    | 2                   |
| Madonnenfinger                                  | 4                   |
| Rattenbissnekrosen (Fingerkuppe)                | 2                   |
| Rattenbissnekrosen (Narbenbildung)              | 3                   |
| Teleangiektasien                                | 2                   |
| Abnorme Nagelfalzkapillaren                     | 2                   |
| Pulmonale arterielle Hypertonie                 | 2                   |
| Raynaud Phänomen                                | 3                   |
| Sklerodermie relevante AK z.B. SCL-70, ANA, ENA | 3                   |
| <b>gesamt</b>                                   | <b>32</b>           |

## Ergebnisse

Der Gesamtscore wurde mit den prozentualen Anteilen der Monozytenpopulationen korreliert und eine Regressionsgerade erstellt.

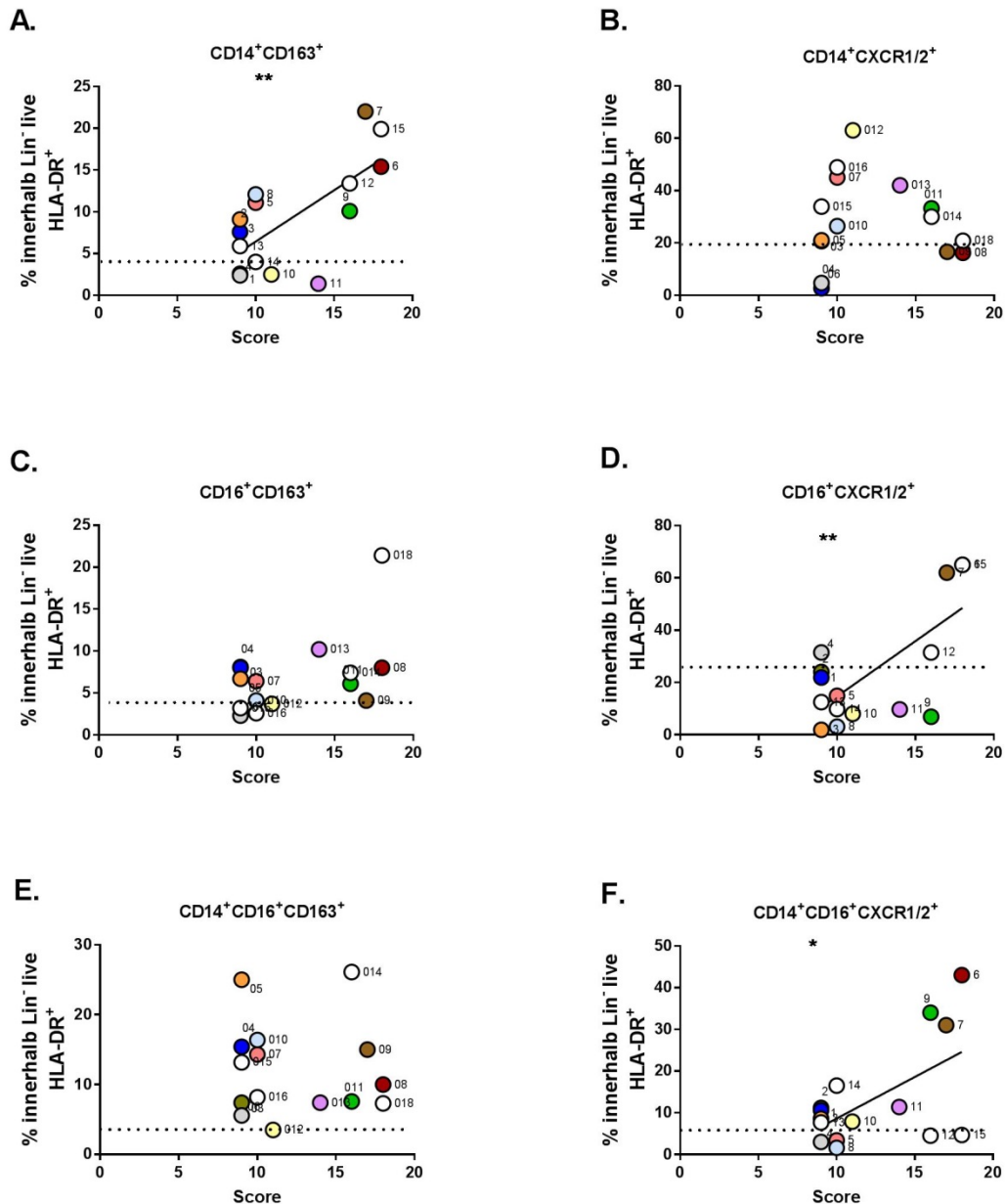


Abbildung 31: Korrelationsanalysen im Vollblut von SSC Patienten.

Dargestellt ist die Korrelation von den durchflusszytometrischen Analysen und den einzelnen Scores von Sklerodermiepatienten. Die gestrichelte Linie gibt den Mittelwert aller gesunden Spender an für die jeweiligen Populationen. (A) Dargestellt sind die Einzelwerte der CD14<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>CXCR1/2<sup>+</sup>(B), CD16<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>(C), CD16<sup>+</sup>CXCR1/2<sup>+</sup>(D), CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>(E), CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CXCR1/2<sup>+</sup>(F)-Zellen in Korrelation mit der Schwere der Erkrankung. Die Daten wurden mit der Pearson-Korrelation berechnet. (CXCR1: C-X-C Motif Chemokine Receptor 1, CXCR2: C-X-C Motif Chemokine Receptor 2). (\*p<0.0332, \*\* p<0.0021) (lineare Regression).

Die Graphen in Abbildung 31 demonstrieren den Schweregrad einzelner Patienten nach Bestimmung des individuellen Scores. Die Einzelwerte wurden mit den Frequenzen der

Patient-spezifischen Immunzellanalyse korreliert. Die gestrichelte Linie in den Graphen beschreibt den Mittelwert der Immunzellpopulation von gesunden Spendern. Der Score wurde mit allen durchflusszytometrischen Analysen durchgeführt, allerdings wurden hier nur die relevanten Graphen aufgeführt. In Abbildung 30 ist zu erkennen, dass die CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> klassischen Monozyten in SSc Patienten stärker frequent sind als in den gesunden Probanden. Da es sich hier um die Mono1 Population handelt, kann man mittels CD163 von inflammatorischen Monozyten ausgehen. Daher wurde dieser Marker für die Korrelation hinzugezogen. Des Weiteren wurde in Studien beschrieben, dass CXCR1/2 eine entscheidende Rolle in der Entstehung von vaskulären Schäden spielt. Ebenso widerspiegelt es ein hohes Differenzierungspotential<sup>71</sup>.

Die Frequenz der CD14<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> Monozyten scheinen in gesunden Spender weniger frequent als in SSc-Patienten zu sein (siehe Abb. 31A). Die CD16<sup>+</sup>CXCR<sup>+</sup> Population korreliert mit der Schwere der Erkrankung. Wohingegen in der CD16<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> Population keine Korrelation berechnet werden konnte (siehe Abb. 31C/D). In Abbildung 31E/F ist die Korrelation der CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CXCR<sup>+</sup> Monozyten zum Score dargestellt und die Regression demonstriert einen signifikante Korrelation, allerdings nicht innerhalb der CD163 Expression.

Der Schweregrad der Hautbeteiligung der SSc-Patienten korreliert signifikant positiv mit der Frequenz CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CXCR1/2<sup>+</sup> und CD14<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>, sowie CD16<sup>+</sup>CXCR1/2<sup>+</sup> Zellen im Blut.

### **3.7.5. Abschließende Zusammenfassung**

Die Heterogenität in der Patientenkohorte erschwert die Aussagekraft dieser Analysen. Allerdings ist zu sagen, dass die Diversität der Monozyten eine wichtige Rolle innerhalb der verschiedenen Schweregrade in SSc Patienten zu spielen. Besonders scheinen die pro-inflammatorischen CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten relevant zu sein. Genauere Genanalysen der einzelnen Monozyten Populationen könnte mehr Aufschluss auf ihre Aktivität in den einzelnen Patienten geben.

## 4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wird anhand von zwei experimentellen Mausmodellen der Sklerodermie (Scl) die zelluläre Infiltration während der Induktionsphase analysiert und versucht, in die frühe Entzündungsphase therapeutisch zu intervenieren.

Die Induktion der Fibrose erfolgt über eine intradermale Injektion von Hypochlorsäure (HOCl) über vier Wochen. HOCl wirkt als direkter ROS-Donor in der Haut. Vergleichend wird das spontane Fra-2 Mausmodell analysiert, das nach 9 Wochen einen sklerodermie-artigen Phänotyp entwickelt, welcher sich nach 16 Wochen in einer systemischen Fibrose äußert. Voruntersuchungen haben gezeigt, dass die tägliche Applikation von HOCl in die Haut zu einer Entzündungsreaktion, die sich klinisch in einer Verdickung der dermalen Struktur durch Ansammlung von Kollagen äußert. In der Frühphase entsteht ein zelluläres Infiltrat hauptsächlich bestehend aus aktivierten dermalen Makrophagen, monozyten abgeleiteten DCs (moDCs) und aktivierten CD11b<sup>+</sup> myeloiden Zellen <sup>65</sup>.

In der Fra-2 Linie wurden bisher Untersuchungen bezogen auf die Vaskulopathie, Fibrose und Inflammation von alveolaren Makrophagen in der Lunge beschrieben. Die zelluläre Inflammation in der Haut wurde bisher in keiner Studie beschrieben. Neue Erkenntnisse werden diesbezüglich in dieser Arbeit dargestellt. Mit verschiedenen Methoden und Techniken wird die Migration myeloider Zellen, deren funktionelle Relevanz für die Entstehung einer Fibrose untersucht. Außerdem werden komparative Untersuchungen von monozytären Zellen im peripheren Blut von Patienten durchgeführt.

### 4.1. Monozyten: Die Schlüsselzellen der dermalen Fibrose

Das myeloide Zellkompartiment, bestehend aus Monozyten, Makrophagen, DCs und Granulozyten, ist nicht nur die erste Immunbarriere sondern orchestriert die Signalwege zwischen der angeborenen und adaptiven Immunität. Myeloide Zellen fungieren als Antigen-präsentierende Zellen und als potente Produzenten von entzündungshemmenden Faktoren. Sie beeinflussen ebenfalls die Differenzierung benachbarter Zellen zum Beispiel durch die Sekretion lokaler gewebespezifischer Zytokine oder Chemokine. Auf diese Weise können myeloide Zellen aktiv zur Progression entzündlicher Erkrankungen beitragen wie zum Beispiel in der systemischen Sklerose <sup>71</sup>.

Im humanen System erfolgt die Klassifizierung von Monozyten wie folgt: klassische CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten, die circa 80–90% der Monozyten ausmachen, die pro-inflammatorischen CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten mit circa 2-5% und die restlichen 2-10% der patrollierenden (nicht-klassischen) CD14<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten. Bei Mäusen sind "klassische" oder inflammatorische Monozyten durch die folgenden Merkmale gekennzeichnet: Ly6C<sup>high</sup>CX<sub>3</sub>CR1<sup>int</sup>CCR2<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD43<sup>low</sup>, wohingegen „nicht-klassische“ oder patrollierende Monozyten als Ly6C<sup>low</sup>CX<sub>3</sub>CR1<sup>high</sup>CCR2<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>CD43<sup>+</sup> definiert sind <sup>3</sup>. Interessanterweise

weisen die patrollierenden Ly6C<sup>low</sup>CD14<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten sowohl im humanen und murinen System eine hohe Heterogenität auf <sup>11,12</sup>.

Die Regulation der Monozytenfrequenz unter inflammatorischen Bedingungen ist von vielen Genen abhängig. Ein wichtiges Gen für die Konversion von Monozyten zwischen inflammatorisch und patrollierend ist Nur77 (NR4α1-Nuklear-Rezeptor). Nur77 ist ein wichtiger Faktor für Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Stoffwechsel und Entzündung <sup>73</sup>. Das Interferon-stimulierte Gen 12 (ISG12) dient als Nur77-Transportprotein im Zellkern. Im *Steady State* kommt es zu einer vermehrten Expression von Nur77-verwandten Genen und zur Bildung von mehr patrollierenden Monozyten. Eine erhöhte ISG12-Expression als Reaktion auf Interferone vom Typ I und II oder Gefäßschäden erhöht den Nur77-Nuklearexport. Bei einer Entzündung kommt es zu einer verringerten Nur77-vermittelten Genexpression und somit zur Bildung entzündlicher Monozyten <sup>74</sup>. In vorausgegangenen Studien konnten wir zeigen, dass ISG-12-defiziente Mäuse nach HOCl Behandlung mehr patrollierende Ly6C<sup>low</sup>-Zellen im Blut auswiesen als WT-Kontrollen <sup>75</sup>. Des Weiteren konnten wir in ISG12 KO Mäusen zeigen, dass eine induzierbare HOCl-Fibrose nicht ausgelöst werden konnte gezeigt durch GT Färbung der Haut. Dies bestätigt sich auch auf RNA Ebene, da diese Tiere eine verringerte Expression nach HOCl-Gabe von TGFβ, Cola1a2 und Col3a1 aufwiesen <sup>75</sup>. Während die Faktoren, die einen entzündlichen Monozytenzustand induzieren und stabilisieren nicht vollständig bekannt sind, lässt jedoch das Fehlen einer Fibrose nach HOCl Induktion in Abwesenheit von Typ-I-Interferonrezeptoren (IFNARs) eine wichtige Rolle für den Zustand der Monozytenaktivierung vermuten <sup>75,76</sup>. Patienten mit systemischer Sklerose weisen in der Frühphase ihrer Erkrankung ein Infiltrat aus CD14<sup>+</sup> Monozyten und dermalen Makrophagen in der Haut auf <sup>77</sup>. In Hautstanzen von Patienten mit Sklerodermie kann zudem eine erhöhte Sekretion von TGF-β beobachtet werden, was hauptsächlich von Fibroblasten produziert wird <sup>72</sup>.

In unseren Untersuchungen konnten wir ebenso ein Infiltrat aus CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> klassischen Monozyten im Blut von SSc-Patienten charakterisieren. Untersuchungen zeigen, dass die Makrophagen nicht nur im gesamten Entzündungsbereich auftreten, sondern hauptsächlich zwischen die Kollagenfasern aktiv einwandern. Dort lassen sich CD68<sup>+</sup>, CD204<sup>+</sup> und CD163<sup>+</sup> M2 Makrophagen detektieren, was auf einen profibrotischen Phänotyp hinweist <sup>78</sup>. Diese profibrotischen Makrophagen sind wichtige Quellen für verschiedene matrixabbauender Enzyme, wie Metalloproteasen (MMPs). ECMs werden durch MMPs (MMP1, MMP8, MMP13, MMP14) und anderen Proteasen wie Cathepsin K gespalten und von weiteren MMPs abgebaut <sup>79</sup>. Damit spielen Makrophagen eine entscheidende Rolle in der Entfernung von überschüssigem Gewebe. Das Makrophagen eine wichtige Rolle innerhalb der Fibroseentstehung besitzen, konnten Studien zeigen, die Hautbiopsien von SSc Patienten auf ihre Genexpression untersucht haben. Dabei konnten drei wichtige Signaturen identifiziert

werden: die Involvierung vom adaptierten Immunsystem, eine dominante Expression von IFN-induzierten Genen und eine verstärkte Signatur von alternativ-aktivierten Makrophagen<sup>80</sup>. Die Relevanz von Makrophagen konnte auch in unseren Mausmodellen der systemischen Sklerose beobachtet werden. Die dauerhafte HOCl-Behandlung führt zu einem Anstieg von dermalen aktivierten Makrophagen (P5) und resultiert nach vier Wochen in einem signifikanten Anstieg von CD64<sup>+</sup> Makrophagen. Im vergleichbaren Bleomycin-Modell konnte nach einwöchiger Behandlung eine Infiltration von F4/80<sup>+</sup> Makrophagen in der Haut detektiert werden<sup>81</sup>. Des Weiteren konnte im Bleomycin-Mausmodell gezeigt werden, dass durch Blockade vom cAMP (*cAMP-Specific Phosphodiesterase-4 Enzyme*), dass die Differenzierung in alternativ-aktivierte Makrophagen verhindert, eine Verbesserung der Fibrose induziert wird<sup>82</sup>. Neben den induzierbaren Modellen wurde in unseren Untersuchungen im spontanen Fra-2 Mausmodell ebenso ein Anstieg von alternativ-aktivierten CD206<sup>+</sup> Makrophagen in der Frühphase (Woche 5) festgestellt, jedoch ändert sich die Infiltration in der Haut in TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> produzierende Zellen (ab Woche). Dabei kann es sich um klassisch-aktivierte Makrophagen oder TIP-DCs handeln. Andere Arbeiten zeigen, dass alternativ-aktivierte Makrophagen in der Haut und in der Lunge von Fra-2 Mäusen signifikant erhöht sind und mit Verschlimmerung der Fibrose die Anzahl an aktivierten Makrophagen steigt. Interessanterweise wurde gezeigt, dass Fra-2 für die Polarisation von alternativ-aktivierten Makrophagen nicht essentiell ist, aber die Expression ist notwendig um pro-fibrotische Faktoren zu produzieren, die wiederum die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten stimulieren<sup>61,83,84</sup>.

In vorausgegangenen Studien konnten wir zeigen, dass im experimentellen HOCl-Sklerodermiemodell hauptsächlich CD11b<sup>+</sup> Zellen sowie T- und B-Zellen in die Läsionen einwandern<sup>65</sup>. Hier handelt es sich vorrangig um inflammatorisch zirkulierende Monozyten CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> und MHCII<sup>+</sup> aktivierte Zellen. Das in dieser Arbeit untersuchte spontan Fibrose-entwickelnde Fra-2 Mausmodell demonstriert ebenfalls einen Influx von myeloiden CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen nach 5 Wochen in der Haut. Eine weitere Charakterisierung dieser Zellen offenbart einen aktivierten inflammatorischen, monozytären Phänotyp (CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>). Detaillierte Analysen des CD11b<sup>+</sup> Zellkompartiment in sklerodermieformierender Haut konnte zeigen, dass es zu einer Verschiebung der CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>low-high</sup>CD64<sup>low-high</sup> Monozyten/Makrophagen und der dermalen dendritischen Zellen (CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>low</sup>CD64<sup>low</sup>) zu aktivierten inflammatorischen myeloiden Immunzellen kommt. Besonders in HOCl-behandelten Tieren konnte eine stark aktivierte Population von dermalen Makrophagen (Ly6C<sup>high</sup>CCR2<sup>low</sup>MHCII<sup>high</sup>) und Monozyten abgeleitete dendritische Zellen (Ly6C<sup>low-high</sup>CCR2<sup>high</sup>MHCII<sup>high</sup>) detektiert werden<sup>65</sup>. Zum derzeitigen Zeitpunkt liegen noch keine Studien vor, die zeigen, dass im spontanen Fra-2 Mausmodell myeloide Zellen in der Haut eine wichtige Rolle spielen. Allerdings ist Fra-2, das AP-1-Transkriptionsfaktor-Familienmitglied Fos-verwandtes Antigen 2, aktiv und direkt an der Regulierung der Fibrose beteiligt.

Präklinische Studien zu *Fosl2* (das für *Fra2* kodierende Gen) transgenen Mäusen zeigte die Bedeutung von *Fra2* in der Entwicklung von SSc-assoziiertes pulmonaler Hypertonie, progressiver peripherer Vaskulopathie und bei der dermalen Produktion von ECM<sup>59,85</sup>. Ebenso konnte eine erhöhte Expression von *Fra2* in Monozyten und von Monozyten abgeleiteten Makrophagen in der Haut von Patienten mit SSc und bei der Bleomycin-induzierten Hautfibrose detektiert werden<sup>86</sup>. Weiterhin berichten andere Gruppen, dass eine Behandlung von Monozyten aus Patienten mit SSc mit einem Toll-like Rezeptor 8 (TLR8) –Agonisten, die Expression von TIMP1 (*Tissue inhibitor of metalloproteinase 1*) und *Fra-2* erhöht im Vergleich zu Monozyten gesunder Personen<sup>86</sup>. Darüber hinaus zeigt diese Studie, dass genetische Inaktivierung von *Fosl2* in Monozyten die TIMP1-Expression reduziert. Weiterhin führt die Ko-Stimulation von Monozyten mit TLR8-Agonisten zu einer erhöhten Expression von TIMP1 und *Fra-2*. Dies induziert einen spindelförmigen profibrotischen Phänotyp in Monozyten, wo mögliche Makrophagen<sup>86</sup>. Indirekte Kokultur-Experimente mit solchen stimulierten spindelförmigen Monozyten und Fibroblasten wiederum zeigt, eine Bildung von  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>-Fasern der dermalen Myofibroblasten. Dies demonstriert eine funktionelle Rolle von Monozyten in der systemischen Sklerose, nämlich in der Differenzierung von Fibroblasten in  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> Myofibroblasten. Allerdings kann bisher niemand die funktionelle Relevanz beweisen, jedoch nur eine Korrelation von Monozyten und der Progression der Erkrankung.

Diese Arbeit hat gezeigt, dass durch eine Depletion der inflammatorisch aktivierten CD11b<sup>+</sup> Zellen die Verdickung der Haut, also die Fibrose, im HOCl-Modell verhindert werden kann. Dies zeigt, dass myeloide CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> Zellen funktionell an der Fibrose im HOCl-Modell beteiligt sind. Auch mit den in dieser Arbeit verwendeten spezifischen Depletionsantikörpern gegen CD11b und Ly6C konnte eine Reduktion von Myofibroblasten ( $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>) erreicht werden.

In SSc Patienten sind vermehrt Myofibroblasten aktiviert, was durch von Monozyten produzierte Faktoren geschieht<sup>72,87</sup>. Monozyten von SSc Patienten erwerben *ex vivo* leicht einen fibrotischen Phänotyp mit Myofibroblasten-ähnlicher Morphologie und zeichnen sich nach M-CSF Stimulation durch eine vermehrte Kollagen Typ I und  $\alpha$ -SMA Produktion aus<sup>87</sup>. Somit sind Monozyten von SSc Patienten in der Lage *ex vivo* zu Myofibroblasten zu differenzieren, allerdings mit geringfügigen funktionellen Kontraktionseigenschaften. Allerdings sind die Hauptproduzenten von Kollagen Typ I Fibroblasten und nicht Monozyten<sup>87</sup>.

Durch die temporäre Depletion von Monozyten können wir die Schwere der Erkrankung im induzierten Mausmodell reduzieren. Nach 7 Tagen finden wir reduzierte Frequenzen von CD64<sup>+</sup> Makrophagen und eine signifikant erhöhte Anzahl Ly6C<sup>+</sup> Monozyten in der Haut myeloid-ablatierter Tiere. Die Ablation der Zellen führt zu einer Depletion von Gewebsmakrophagen (CD64<sup>+</sup>), wodurch Gewebsnischen freiwerden. Diese können von

inflammatorischen Ly6C<sup>high</sup> Zellen besiedelt werden, die dann in Makrophagen differenzieren oder residente Gewebemakrophagen proliferieren und füllen somit die Nischen auf <sup>23</sup>. Differenzierte Makrophagen werden durch unser Depletionsprotokoll unterschiedlich beeinflusst: CD11b<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> klassisch aktivierte Makrophagen sind nach der Depletion signifikant erhöht, wohingegen CD11b<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> „Wundheilungs-spezifische / profibrotische“-Makrophagen in beiden Gruppen depletiert werden. Dieser Effekt gleicht sich nach vier Wochen wieder aus. Die klassisch aktivierten Makrophagen scheinen durch die Depletion nicht beeinflusst zu werden. Die wiederkehrende Population nach der Depletion demonstrierte nach 10 Tagen vermehrt dermale Makrophagen (P4, P5), wohingegen die Injektion von HOCl für 18 weitere Tage zu einem Ausgleich von aktivierten Makrophagen (P5), moDCs und aktivierten moDCs führte (P2,P3). Die Depletion führt zu einer Auslöschung von „Wundheilungs-spezifische / profibrotische“-Makrophagen, was wiederum potentiell profibrotische Zellen reduziert. Um die Rolle von myeloiden Zellen in der Pathogenese der systemischen Sklerose zu identifizieren, wurden in anderen Studien CD11b-DTR Mäuse verwendet. Nach der Gabe von Diphtherietoxin (DT) werden selektiv myeloide Zellen depletiert, die dann nicht mehr im System detektiert werden können <sup>88</sup>. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass es durch die Depletion von Makrophagen in CD11b-DTR Mäusen mittels DT zu einer Reduktion vom Narbengewebe und Myofibroblasten während der frühen Entzündungsphase der fibrotischen Antwort kommt. Im Gegensatz dazu verbleibt die Fibrose, wenn die Makrophagen erst in der späten Erholungsphase depletiert werden <sup>7</sup>.

In einem Mausmodell der Lungenfibrose (Bleomycin) führte die Depletion klassischer Ly6C<sup>high</sup>-Monozyten zu einer geringeren Fibrose und zusätzlich führte die adoptive Übertragung dieser Monozyten zu einer verstärkten Fibrose <sup>89</sup>. Obwohl die Depletion klassischer Ly6C<sup>high</sup>-Monozyten zu einer Abnahme profibrotischer Makrophagen (Ym1-positive alternativ-aktivierte Makrophagen) führte, konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden, dass diese Makrophagen aus klassischen Ly6C<sup>high</sup>-Monozyten stammen. Eine weitere Studie mit zwei Mausmodellen der Leberfibrose zeigte, dass die Hemmung von Ly6C<sup>high</sup>-Monozyten während der Depletionsphase die Fibroseentstehung reduzierte <sup>90</sup>. Dies zeigt, dass auch bei der Leberfibrose die klassischen Ly6C<sup>high</sup>-Monozyten zum fibrotischen Prozess beitragen. Mewhort und Kollegen beschreiben, dass humane Monozyten aus peripherem Blut die Aktivierung von Herzfibroblasten zu Myofibroblasten über eine direkte Wechselwirkung in höherem Maße induzieren können als TGF- $\beta$  <sup>91</sup>.

In unserer Arbeit ist die effiziente Depletion der CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> Zellen nur bis Tag 7 möglich, da vermutlich ab der fünften Injektion blockierende Antikörper gegen die Depletionsantikörper aus der Ratte gebildet werden und deshalb keine Depletionswirkung mehr messbar ist. Aus diesem Grund ist die Depletion als Therapieoption im spontanen Fra-2 Mausmodell nicht

durchführbar. Dieses Phänomen ist auch in der humanen Therapie mit monoklonalen Antikörpern bekannt. Patienten, die einen monoklonalen Antikörper bekommen haben, zeigen nach einigen Monaten Therapie eine Zunahme von körpereigenen Antikörpern, die gegen die monoklonalen Antikörper gerichtet waren. Die Wirksamkeit ist somit stark eingeschränkt bis aufgehoben<sup>92</sup>. Daher eignen sich Antikörper nicht als Langzeittherapie, jedoch kann eine Intervention in die Rekrutierung myeloider Zellen ein möglicher Angriffspunkt darstellen.

Dass Zellen monozytären Ursprungs wichtig für die Fibroseentwicklung sind haben wir und andere eindrucksvoll zeigen können. Doch wo kommen diese Zellen her und welche Prozesse sind für die Zellrekrutierung ins Gewebe verantwortlich? Die Migration von inflammatorischen Monozyten in die Blutbahn ist abhängig von CCR2 und geringen Mengen von CXCR4<sup>93</sup>. In der Blutbahn migrieren sie über CCR2 ins Gewebe regulieren Ly6C runter und werden zu patrollierenden Monozyten<sup>3</sup>. Um die Relevanz von Monozyten, welche aus dem Knochenmark rekrutiert werden zu testen, haben wir CCR2 KO Mäuse verwendet. Hierbei haben wir festgestellt, dass junge CCR2 KO Tiere vermehrt Ly6C<sup>high</sup>CD43<sup>low</sup> inflammatorische Monozyten im Blut aufweisen, wohingegen ab einem Alter von 30 Wochen vermindert inflammatorische, jedoch mehr patrollierende Ly6C<sup>low</sup>CD43<sup>high</sup> Zellen zu finden sind. Womöglich dienen unter entzündlichen Bedingungen andere Organe als Monozytenreservoir, wie zum Beispiel die Milz<sup>67</sup>. Studien zeigen, dass eine chirurgisch induzierte Ischämie des Myokards in einer verringerten Ly6C<sup>high</sup> Monozytenpopulation in der Milz aber einer vermehrten Ansammlung am Entzündungsherd resultiert<sup>10</sup>. Neben patrollierenden Monozyten im Blut, können von uns signifikant erhöhte Ly6C<sup>high</sup> Monozyten im Knochenmark alter CCR2 KO Tiere detektiert werden. Studien im Bleomycin-Modell, d.h. der Induktion von systemischer Sklerose mit einem Zytostatikum, resultiert in einer verminderten Ansammlung von Kollagen (Hydroxyproline-Assay) verglichen zum Wildtyp in der Lunge. Allerdings lässt sich aus den Daten ablesen, dass trotz einer Reduktion der Fibroseentwicklung auch in CCR2 KO Tieren die Fibrose deutlich induzierbar ist<sup>94</sup>. Wie zuvor schon beschrieben, scheinen Monozyten nicht nur aus dem Knochenmark in entzündete Areale einzuwandern. Bei der Geburt ist die Leberhämatopoese immer noch aktiv und erzeugt „Leber“-Monozyten, welche in der Lage sind in entzündliche Gewebe zu wandern. Die hämatopoetische Nische des Knochenmarks reift noch und rekrutiert weiterhin HSCs, während die Monozytopoese bei Erwachsenen weitestgehend im Knochenmark stattfindet. Vermutlich werden CXCR4<sup>+</sup> Monozyten-Vorläufer Zellen in der Knochenmarks-Nische zurückgehalten, bis die Lebernische komplett entleert ist<sup>67</sup>. Des Weiteren wird die Milz als wichtiges Reservoir für klassische Monozyten unter inflammatorischen Bedingungen beschrieben. Und in der Tat zeigen splenektomierte Mäuse in unseren Versuchen eine reduzierte Fibrose, sowie eine verminderte Inflammation von Monozyten und Makrophagen in die Organe. Untersuchungen in splenektomierten Mäusen, bei denen ein ischämischer Myokard ausgelöst wird, zeigen eine massive Reduktion von circa

75% Ly6C<sup>high</sup> Monozyten verglichen zu Tieren mit einer Milz. Die Autoren schließen daraus, dass nach Induktion vom Myokard Monozyten erst aus der Milz mobilisiert werden <sup>10</sup>. Wir können zeigen, dass die Induktion mit HOCl in splenektomierten Mäusen zu einer verminderten monozytären Inflammation und reduzierten Fibrose führt. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass hautinfiltrierende Monozyten in der Sklerodermie aus der gesamten Peripherie vor allem der Milz und nicht, wie zuvor beschrieben, ausschließlich aus dem Knochenmark rekrutiert werden.

Aus Monozyten differenzierte Makrophagen und DCs sind essentiell für die Initiation der adaptiven Immunantwort und an der Regulation dieser Prozesse sind Tregs beteiligt. Autoimmunität ist oft eine Folge der Dysfunktion in diesen Regulationsprozessen. Tregs können in der Wundheilung die Monozytenaktivität hemmen und die Makrophagenpolarisation mit verschiedenen Zytokinen (IL-10, TGF- $\beta$ ) in einen entzündungshemmenden Phänotyp differenzieren. Es wird beschrieben, dass dann wiederum die entzündungshemmenden Makrophagen durch die Produktion von IL-10 und TGF- $\beta$  Tregs beeinflussen <sup>95</sup>.

Unsere Arbeit zeigt, dass in beiden Modellen in der frühen Inflammationsphase verringerte Treg-Frequenzen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) in der Haut zu finden sind. Wohingegen in der fibrotischen Phase vermehrt Tregs in der Haut beobachtet werden. Diesbezüglich können in beiden Modellen in der Frühphase aktivierte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen in der Haut sowie im Lymphknoten beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

In Patienten mit Sklerodermie wird zudem erhöhte Konzentrationen der Th2 Zytokine IL-4, IL-13, IL-10 beschrieben, die positiv mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelieren <sup>96</sup>. In der systemischen Sklerodermie besteht ein Ungleichgewicht von Th1- und Th2 -Zellen, mit einer Tendenz zur Th2 Polarisation <sup>51</sup>. Die erhöhte Konzentration der Th2-Zytokine kann die Entstehung von Foxp3<sup>+</sup> Tregs begünstigen, die im Maussystem als CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> charakterisiert werden <sup>97</sup>. In der akuten Phase der Erkrankung weisen SSc Patienten vermehrt Tregs (CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>) im Blut und Gewebe auf. Interessanterweise zeigen Studien, dass das Plasma von SSc Patienten eine supprimierende Wirkung auf Tregs von gesunden Patienten aufweisen, was für spezifische lösliche Faktoren spricht, die die Treg Funktion von SSc Patienten hemmen <sup>98</sup>. Kreuzversuche zeigen diese Wirkung allerdings nicht. Zum anderen stimmen verschiedene Studien überein, dass Tregs, unabhängig von ihrer Anzahl, nicht in der Lage sind hemmende Zytokine zu produzieren oder Effektor-T Zellen zu supprimieren. In der Literatur besteht eine allgemeine Übereinstimmung hinsichtlich der verminderten funktionellen Kapazität von zirkulierenden Tregs in SSc, typischerweise begleitet von der verminderten Expression von Foxp3 und wahrscheinlich mit einer Hypermethylierung des Foxp3-Promotors und/oder verminderten Expression von Runx1 <sup>99</sup>. Es scheint, dass einige Patienten, insbesondere diejenigen mit aktiver Erkrankung erhöhte Zahlen von zirkulierenden Tregs aufweisen. Parallel hierzu kommt es zu einer Expansion von aktivierten

CD4<sup>+</sup> -Zellen. Dies kann die hemmende Reaktion des Immunsystems auf die unangemessene Aktivierung oder als Ausgleich zur Abnahme der suppressiven Aktivität erklären<sup>100</sup>.

Jedoch lassen sich diesbezüglich keine genaue Aussage treffen, da im humanen System die Treg Marker ungenügend definiert sind. Es kann sich in diesem Fall auch um aktivierte T-Zellen handeln.

In Hautläsionen und im peripheren Blut von SSc Patienten werden vermehrt CD4<sup>+</sup> T-Zellen detektiert<sup>99</sup>. Kürzlich wurde dokumentiert, dass CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Zellen in Hautläsionen von SSc Patienten vorkommen, die wiederum hohe Mengen an IL-4 sekretieren<sup>101</sup>. Unsere Daten zeigen, dass der Anstieg der CD4<sup>+</sup>Zellen in der Frühphase der Erkrankung auch im spontanen Fra-2-Modell sowie im induzierten Mausmodell beobachtet werden kann. Allerdings können wir keine Veränderung in der Frequenz der CD8<sup>+</sup> Zellen feststellen (Daten nicht gezeigt).

Somit bietet die frühe Inflammationsphase ein potentiell Ziel für Interventionen mittels geringen Dosen IL-2 (Interleukin-2). IL-2 oder auch als T-Zell-Wachstumsfaktor bekannt, ist ein hochaffiner Rezeptor auf T-Zellen<sup>102</sup>. Eine geringe Dosierung mit IL-2 führt zu einer Expansion von Tregs<sup>103</sup>. *In vivo* Experimente mit Blutproben von Systemischer Lupus erythematodes (SLE) Patienten zeigte, dass das Fehlen von IL-2 durch die Produktion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen für den Verlust von Tregs verantwortlich ist. Vorläufige Daten bei wenigen Patienten die niedrig-dosiertes IL-2 erhielten, zeigen einen Anstieg der Tregs im Blut<sup>104</sup>. Daher ist die IL-2-Therapie ein vielversprechender Weg zur Expansion von Treg-Zellen und somit eine Verbesserung der klinischen Ergebnisse für Patienten mit Autoimmunerkrankungen<sup>99</sup>.

Auf ähnlicher Weise führt die Anti-CD25 Therapie zur Prävention von aktivierten T-Zellen und somit zur Hemmung von T-Zell Antworten. Mittels Basiliximab, einem chimären monoklonalen Anti-CD25 Antikörper, wurden zehn SSc Patienten mit schwerer Hautbeteiligung behandelt. Die Ergebnisse zeigen eine Verringerung der Hautfibrose und Verbesserung der Lungenfunktion. Allerdings kann die Anwendung dieser Therapie bei Autoimmunerkrankungen kontraproduktiv sein, da nicht nur Tregs CD25 exprimieren, sondern auch aktivierte T-Zellen

<sup>105</sup>.

#### 4.2. Manipulation der frühen Inflammation als therapeutisches Ziel

Die derzeitige Behandlung der systemischen Sklerose zielt darauf ab, Symptome der Erkrankung zu behandeln und symptomatisch zu lindern. Die Beziehungen zwischen Vaskulopathie, Störungen des Immunsystems und einer massiven Fibroblastenaktivierung sind komplex und können die Identifizierung der Wirksamkeit eines einzelnen Therapeutikums in Frage stellen. Die Hautsklerose wird mit Hilfe des modifizierten Rodnan Skin Score (mRSS), ein robuster Marker für SSc, bewertet. Neben dem allgemeinen Hautscoring wird ebenso auch die Organfibrose hinzugezogen<sup>106</sup>.

Wir konnten zuvor zeigen, dass Monozyten als erste Zellen in entzündliche, fibrotische Haut einwandern<sup>65</sup>. Monozyten-Depletion mit spezifischen Antikörpern in der Frühphase der Scl Induktion vermindert die Fibrose, allerdings ist eine anhaltende Depletion effektiver, was mit diesen Antikörpern nicht möglich ist und diesen Ansatz daher als Therapieoption ausschließt. Wünschenswert wäre eine Blockade der Rekrutierung von Entzündungszellen in die Haut. Die Rekrutierung von Monozyten in das entzündliche Gewebe und deren Differenzierung zu Makrophagen und dendritischen Zellen sind nur ungenügend beschrieben. Chemokin-Rezeptor (CCR) 2 bindet die Chemokine CCL2 und CCL7<sup>107</sup>. Entzündliche Chemokinrezeptoren wie CCR2 sind für die Rekrutierung von Zellen bei akuten Entzündungsreaktionen von entscheidender Bedeutung, wie eine kürzlich erschienene Veröffentlichung zeigt, in der die Depletion des gesamten entzündlichen CCR-Locus (CCR 1,2,3,5) zu einer verminderten Zellrekrutierung in die Haut führte<sup>69</sup>. Dass CCR2 und andere Chemokinrezeptoren für die SSc-Pathogenese relevant sein könnte, zeigen Untersuchungen zum Expressionslevel von CCL2, CCL5 (auch bekannt als RANTES) und CCL3 (auch bekannt als MIP1 $\alpha$ ) in SSc-Haut im Vergleich zu Haut gesunder Spender. Darüber hinaus korreliert die erhöhte CCR2/CCR2-Expression mit dem Schweregrad der Haut- und Lungenfibrose<sup>108–111</sup>. Fibroblasten von SSc-Patienten exprimieren CCR2, aber dieser Befund wird von anderen Studien noch nicht bestätigt<sup>40</sup>. Wie CCL2 profibrotische Effekte vermittelt, ist nicht klar, aber ein möglicher Mechanismus ist der indirekte Beitrag von CCL2 zur Fibrose in SSc durch Förderung der Differenzierung von IL-4-produzierenden T-Zellen, die dermale Fibroblasten aktivieren, die wiederum Typ I Kollagene produzieren<sup>112</sup>.

Wir haben in diesen Versuchen einen CCL2/CCR2 spezifischer L-RNA Aptamer (mNOX-E36, Noxxon Pharma, Berlin) verwendet, um CCR2/CCL2 abhängige Signalwege in der Peripherie zu blockieren. Die Behandlung mit mNOX-E36 führt im spontanen sowie im induzierten Mausmodell zu einer verminderten Inflammation und einer signifikant reduzierten Fibrose in der Haut. Der spezifische L-RNA Aptamer wurde hierbei sehr gut in beiden Mausmodellen der Sklerodermie vertragen. Der Aptamer wurde zuvor in Type 2 Diabetes und in Nierenerkrankungen in ersten Patientenstudien getestet<sup>99</sup>. Präklinische Studien haben gezeigt, dass die Behandlung mit einem inhibitorischen CCL2 Spiegelmer den Rückgang der Nierenfunktion sowie das Fortschreiten der Krankheit in Tiermodellen von Diabetes signifikant verzögern kann<sup>113</sup>. Somit erweist sich die Blockade der Rekrutierung von Entzündungszellen, als effektive Therapieoption, im Vergleich zur Anwendung spezifischer Depletionsantikörper. Eine klinische Studie mit einem humanen CCR2-Blockierenden Antikörper gegen Rheumatische Arthritis (RA) reduziert zwar die CCR2 Expression auf CD14<sup>+</sup> Monozyten, jedoch resultiert dies nicht in einer Verbesserung der Synovialität bei aktiver RA<sup>114</sup>. Ein möglicher Grund kann sein, dass die Erkrankung schon zu weit fortgeschritten war und somit irreversibel ist. Eine frühe Intervention kann zu einer Verbesserung der Synovialität führen,

jedoch sind das Chemokin-Rezeptor-System und die entsprechenden Chemokine sehr redundant. Das Blockieren eines einzigen Chemokinrezeptors ist möglicherweise nicht ausreichend<sup>69</sup>. Die erhöhte CCR2 Expression in SSc Patienten führt zu einer vermehrten Ansammlung von Monozyten und Makrophagen im Gewebe<sup>115</sup>.

Untersuchen zeigen, dass SSc Patienten mit einer limitierenden Verlaufsform signifikant erhöhte CD14<sup>+</sup> klassische Monozyten aufweisen, wobei die diffuse Form der Sklerodermie vermehrt CD16<sup>+</sup> nicht klassische Monozyten im Blut akkumulieren. Im peripheren Blut von SSc Patienten konnten wir eine leicht erhöhte Expression von CD14<sup>+</sup> klassischen Monozyten verglichen zu Gesunden beobachten. Die meisten eingeschlossenen Patienten in unserer Studie wiesen eine limitierende Verlaufsform auf. Dies deckt sich mit anderen Studien, da SSc Patienten mit einer limitierenden Verlaufsform signifikant erhöhte CD14<sup>+</sup> klassische Monozyten aufwiesen. Ebenso kann in dieser Arbeit eine erhöhte Expression von CD163 auf allen Monozyten- Subpopulationen festgestellt werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass SSc Patienten mit einer Lungenbeteiligung vermehrt CD204<sup>+</sup> CD163<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>TLR4<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> und CD14<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> CD204<sup>+</sup>TLR4<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> M1/M2 Makrophagen/Monozyten, am wahrscheinlichsten jedoch aktivierte Monozyten, im Blut aufweisen<sup>116</sup>.

Die RNA-Sequenzierungsstudie von Villani et al. identifizierte 2017 vier Monozyten (Mono1 bis Mono4) und sechs DC (DC1 bis DC6) Populationen im menschlichen Blut<sup>12</sup>. Mono1 und Mono3 entsprechen den klassischen CD14<sup>+</sup> Monozyten (cMo), Mono2 den nicht-klassischen (patrollierenden) CD16<sup>+</sup> Monozyten und Mono4-Zellen charakterisiert folgendes Expressionsmuster: GZMH (Granzyme H), NKG7 (Protein NKG7/ *G-CSF-induced gene 1 protein*) und GNLY (Granulysin). Daher werden sie als CD16<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>low</sup> NK-Zellen klassifiziert. Untersuchungen in SLE sowie SSc Patienten stellen eine erhöhte Expression von inflammatorischen CD14<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> Zellen im Blut dar, die vermehrt hohe Level an proinflammatorischen Mediatoren sekretieren<sup>117</sup>. Der Score der Patienten korreliert mit der Frequenz der CD14<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> Monozyten. Des Weiteren können wir eine erhöhte Siglec 10 Expression in den patrollierenden Monozyten detektieren. Dabei handelt es sich um ein Sialsäure-bindendes Ig-ähnliches Lectin 10, ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie welches als inhibitorischer Rezeptor wirkt<sup>118</sup>.

Eine kürzlich durchgeführte Studie hat gezeigt, dass Siglec 10 vermehrt auf menschlichen *ex vivo* generierten moDCs exprimiert wird, wobei Siglec 10 mit Zucker interagieren kann, um die IL-10-Produktion zu fördern<sup>118</sup>. Es wurde gezeigt, dass Siglec 10 mit CD24 interagieren kann. Diese Wechselwirkung dämpft die proinflammatorische TLR-Signalisierung (TLR2, TLR4) in Reaktion auf eine Vielzahl von DAMPs (*danger-associated molecular pattern*), die durch beschädigte Zellen freigegeben werden, wie z.B. Kernprotein Hochmobilitätsgruppenfeld 1 (HMGB1) und Hitzeschockproteine HSP70 und HSP90<sup>119,120</sup>. Frühere Studien zeigen, dass

während der Zellschädigung und Zelltod, Moleküle wie HMGB1, HSPs und möglicherweise HMGB1 die Produktion von entzündlichen Zytokinen in einer TLR2-abhängigen Art und Weise sowie die Produktion von Anti-dsDNA-Antikörpern in BALB/c-Mäuse induzieren<sup>121</sup>. Somit kann die Störung von Siglecs die Entwicklung von Autoimmunität fördern<sup>120</sup>.

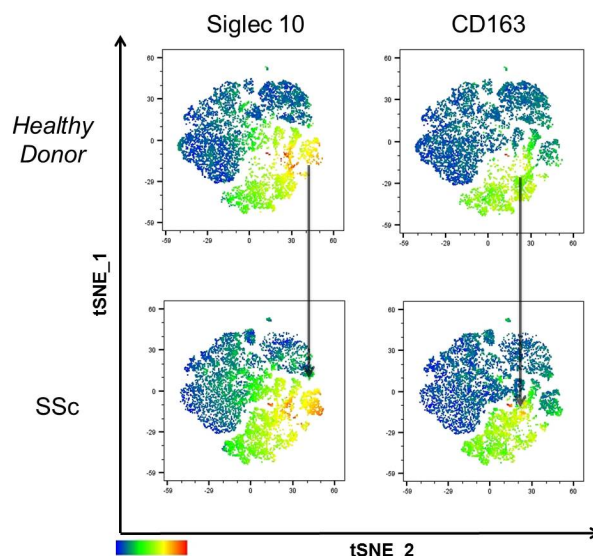


Abbildung 1: Monozytenvergleich von gesunden Spendern zu SSc Patienten mittel t-SNE-Clusteranalyse.

t-SNE Plots zeigen die Expression von Siglec 10 und CD163 in Gesunden Spendern und SSc Patienten. Rot demonstriert hohe und blaue niedrige Expression. Die schwarzen Pfeile demonstrieren die erhöhte Expression in SSc Patienten. (n= 5 pro Gruppe) (HD: Healthy Donor; SSc: Systemische Sklerose)

In der systemischen Sklerose ist der Auslöser, der den Gewebsschaden herbeiführt, noch nicht genau geklärt. Man geht davon aus, dass aufgrund des Zellsterbens DNA frei wird, was als sogenannte DAMPs TLRs (TLR8, TLR9) oder IFN Signalwege aktiviert und dadurch die Gefäßwand geschädigt wird<sup>122</sup>.

Die Mono3 Population zeigt ebenso eine Korrelation mit dem Schweregrad der Erkrankung in unseren Untersuchungen. Aufgrund der CXCR1/CXCR2 Expression haben diese Zellen ein hohes Potential zur Differenzierung und Migration<sup>12</sup>. Daher kann es sich hierbei um eine Population handeln die das Potential hat, in Mono1 oder Mono2 zu differenzieren.

Zurzeit sind einige der laufenden oder gerade abgeschlossenen klinischen Studien daran interessiert indirekt das myeloide Kompartiment als therapeutisches Ziel zu adressieren. Beispielsweise werden folgende Ziele therapeutisch angegriffen: TGF $\beta$ -Signalwege (Fresolimumab), IL-6R Signalisierung (Tocilizumab) oder VEGFR, FGFR und / oder PDGFR-Signalisierung (Nintedanib). Nintedanib stoppt die Polarisation von M (IL-4) –Zellen<sup>83</sup>. Interessanterweise, hemmt Fresolimumab, zusätzlich direkt die TGF $\beta$ -regulierte Genexpression und reduziert auch die Expression von CD163 und MS4A4A (Makrophagen-

assoziiert Gen) in der Haut. Dies deutet auf eine indirekte Wirkung auf die Differenzierung myeloider Zellen hin<sup>123</sup>. Anti-TGF $\beta$ -Behandlung blockiert die Differenzierung von Monozyten zu Myofibroblasten, was die Entwicklung einer Myokardfibrose verhindern kann<sup>72</sup>. Die Signalgebung über TGF- $\beta$  ist ein wesentlicher biologischer Prozess, der die Reparatur und den Umbau von Gewebe steuert. In der Pathogenese von SSc ist die Homöostase gestört, was zu einer Überaktivierung des TGF- $\beta$  und zu einer massiven Fibrose führt<sup>124</sup>. Neben der Anti-TGF- $\beta$  Blockierung können Studien zeigen, dass der Nur77 (NR4 $\alpha$ 1-Nuklear-Rezeptor) als endogener Inhibitor auf TGF- $\beta$  wirkt und somit ein potentiell Ziel für antifibrotische Therapien darstellt<sup>73</sup>. Während der Wundheilung wird vorübergehend TGF- $\beta$  von Makrophagen und Fibroblasten hochreguliert, dies induziert Nur77-Expression in Fibroblasten und erzeugt dadurch einen negativen Regulationsmechanismus<sup>125</sup>. Die dauerhafte Aktivierung von TGF- $\beta$  in fibrotischen Erkrankungen führt zu einer Inhibition über PKB- (Protein Kinase B) HDAC (Histon-Deacetylasen) - abhängige Mechanismen von Nur77. Die Folge ist, dass weniger Nur77 vorliegt und führt somit zu einer vermehrten Produktion von entzündlichen Monozyten<sup>74</sup>. Kleinmolekulare Nur77-Agonisten (z.B. Cytosporone – B) können diesen Mangel an aktivem Nur77 überwinden und hemmen experimentell induzierte Haut-, Lungen-, Leber- und Nierenfibrose bei Mäusen. Studien zeigen, dass Nur77-Agonisten die regulatorische Aktivität von Nur77 wiederherstellen und somit die TGF- $\beta$  Signalübertragung begrenzen. Dies beendet die übermäßige Gewebsantwort und die Fibrose wird gehemmt<sup>73,75</sup>. Nur77 ist nicht Monozytenspezifisch, es spielt auch eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung und Proliferation in murinen und humanen T-Zellen. Ergebnisse identifizieren Nur77 als einen zentralen Regulator des T-Zell-Immunstoffwechsels, der die T-Zell-vermittelte Autoimmunität einschränkt<sup>126</sup>.

Die Behandlung in der Frühphase der SSc ist ein wichtiger Schritt, da so die irreversible Fibrosebildung verhindert werden könnte. Aufgrund der Zunahme von inflammatorischen Monozyten in den ersten Wochen der Fibroseinduktion stellt die Blockade dieser monozytären Entzündungsreaktion ein vielversprechendes Therapieziel dar. Aufgrund der Vielzahl an Nebenwirkungen von Antikörper-basierten Therapeutika, stellt die Blockierung der CCR2/MCP-1/3-Achse über Apatmere wie mNox-E36 ein attraktives Werkzeug für die SSc-Therapie dar.

Die rasante Entwicklung von *Single-Cell-Technologien* wie *Single-Cell-RNA-Sequenzierung* und *Massenzytometrie* ermöglicht den Nachweis der Genexpression und Änderungen an der Aktivierung sowie die Bestimmung myeloider Zellpopulationen. Für die Zukunft sind hochdimensionale Analysen von Blut und Gewebe von SSc Patienten notwendig, um molekulare Faktoren zu identifizieren, um mögliche Therapeutika entwickeln zu können<sup>72</sup>. Allerdings ist es ebenso notwendig die funktionelle Relevanz zu testen. Dies ist in humanisierten Mausmodellen wie der MISTRG (M-CSF<sup>h/h</sup> IL-3/GM-CSF<sup>h/h</sup> SIRP<sup>a</sup><sup>h/h</sup> TPO<sup>h/h</sup>

RAG2<sup>-/-</sup> IL2Rg<sup>-/-</sup>) möglich. MISTRG sind hoch immundefiziente Mäuse, denen T- und B-Lymphozyten und NK-Zellen fehlen, wodurch eine Immunabstoßung des menschlichen Transplantats verhindert wird. Sie exprimieren das humane SIRPα-Protein, ein "Don't-Eat-Me"-Signal, das humane Zellen vor Phagozytose schützt. Schließlich werden mehrere Zytokin-kodierende Gene durch *Knock-In's* humanisiert, was zu Defekten in Mauszellpopulationen und zur Unterstützung menschlicher Zellen führt. Somit lassen sich hoch spezifisch verschiedene Therapeutika funktionell *in vivo* testen, wodurch eine schnelle und effektive Entwicklung von Therapeutika gewährleistet ist <sup>127</sup>.

## 5. Zusammenfassung

Die systemische Sklerose ist eine komplexe Autoimmunerkrankung, die sich in Fibrose, das heißt einer Akkumulation von extrazellulären Matrixproteinen, insbesondere Kollagen in der Haut und Organen, wie Lunge und Niere, äußert. Der pathologische Mechanismus und die Sequenz der Ereignisse besonders im Hinblick auf die Frühphase der Erkrankung, welche letztlich zur Fibrose führen sind bislang noch nicht vollends aufgeklärt. Die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), vaskuläre Schäden und lokale zelluläre Infiltration sind frühe Charakteristika der humanen Erkrankung.

Die Rekrutierung von Zellen des angeborenen Immunsystems in der frühen Entzündungsphase sind bislang nicht komplett untersucht. Daher liegt der Fokus der Arbeit auf den frühen entzündlichen Prozessen in der Induktionsphase, da dort potentiell mit therapeutischen Reagenzien die Immunzellantwort moduliert werden kann. Hierfür werden zwei verschiedene Mausmodelle, das chemisch-induzierte HOCl-Modell und das spontane Fra-2 Modell, verwendet, da sie in der Summe umfassend Aspekte der humanen Erkrankung widerspiegeln. Durchflusszytometrische Analysen beider Mausmodelle demonstrierten ein myeloides Infiltrat ( $CD11b^+Ly6C^+$ ) sowie im spontanen Mausmodell eine verstärkte Differenzierung von Makrophagen. Die Depletion von  $CD11b^+Ly6C^+$  Monozyten in der Frühphase der chemisch induzierten Fibrose resultierte in einer verminderten Myofibroblastenaktivierung und Fibrose, was zu einer reduzierten Schwere der Erkrankung führt. Die Hemmung von CCR2/CCL2 in der Peripherie durch Applikation vom spezifischen L-RNA-Aptamer (mNOX-E36, NOXXON) führte zu einer verminderten Anzahl von entzündlichen  $Ly6C^{hi}$  Monozyten, sowie in einer reduzierten Fibrose in beiden Mausmodellen der systemischen Sklerose. Diese Erkenntnis weist auf eine Schlüsselrolle von  $CCR2^+$  entzündlichen Monozyten und die CCR2/CCL2 Achse bei der Entwicklung von Fibrosen hin. Da nicht nur Zellen aus dem Knochenmark in entzündetes Gewebe rekrutiert werden, haben wir uns in dieser Arbeit ein weiteres Reservoir für Monozyten angeschaut: die Milz. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mäuse ohne Milz eine reduzierte Monozytenrekrutierung in die Haut und dadurch weniger Fibrose entwickelten. Dies legt nahe, dass hautinfiltrierende Monozyten in der Sklerodermie aus der gesamten Peripherie und nicht, wie zuvor beschrieben, ausschließlich aus dem Knochenmark rekrutiert werden. Des Weiteren wurden vermehrt  $CD4^+$  T-Zellen in der Haut beider Mausmodelle detektiert. Der Anstieg von  $CD4^+$  T-Zellen ging mit reduzierten Treg ( $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ ) Zahlen einher, wodurch ein pro-inflammatorischer Phänotyp wiederspiegelt wurde. Zudem wurden in einer Patientenkohorte monozytäre Populationen im Blut von SSc Patienten im Vergleich mit gesunden Spendern untersucht und charakterisiert. Es konnte eine erhöhte Expression von Siglec 10 in den patrollierenden Monozyten detektiert werden. Des Weiteren korrelierte der Score der SSc Patienten mit der Frequenz der  $CD14^+CD163^+$  Monozyten. Unsere Studie zeigt, dass

entzündliche Monozyten, die aus der Milz rekrutiert werden und über den CCR2 / CCL2-regulierten Mechanismus in das Gewebe gelangen, entscheidende Treiber für die Entwicklung der Hautfibrose sind. Intervention der CCR2 / CCL2-Achse, möglicherweise über Aptamere, könnten für SSc-Patienten ein vielversprechender therapeutischer Weg sein.

## 6. Summary

Systemic sclerosis (SSc) is a chronic autoimmune connective tissue disease which manifests in fibrosis characterized by an accumulation of extracellular matrix (ECM) proteins in the skin and organs such as lung and kidney. The production of reactive oxygen species (ROS), vascular damage and a cellular infiltration consisting of monocytes/macrophages are early characteristics of the disease. The mechanisms and the sequence of events leading to fibrosis, with special regard to the early phase of the disease are not fully understood. Especially the function of the cellular infiltrate in the early phase remains incompletely covered. Therefore this study focused on the inflammatory processes to identify potential therapeutic targets of SSc immune modulations.

To this end, we studied two different mouse models of systemic sclerosis reflecting different aspects of the human disease: the chemically-induced HOCl model and the spontaneous Fra-2 model.

Flow cytometric analysis of both mouse models demonstrated myeloid infiltration (CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>) as well as differentiation of macrophages in the spontaneous mouse model.

Depletion of CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> monocytes in the early phase of chemically-induced fibrosis resulted in decreased myofibroblast activation, diminished fibrosis and reduced severity of the disease. Inhibition of CCR2/CCL2, as major driver of monocyte recruitment, in the periphery by application of the specific L-RNA aptamer (mNOX-E36, NOXXON) resulted in a decreased number of inflammatory Ly6C<sup>hi</sup> monocytes and inhibited dermal fibrosis in both mouse models of systemic sclerosis. These findings indicate a pivotal role for CCR2<sup>+</sup> inflammatory monocytes and the CCR2/CCL2 axis in fibrosis development. As is known, the red pulp of the spleen also acts as a large reservoir for monocytes in addition to the bone marrow. Of note, mice lacking the splenic monocyte reservoir failed to recruit monocytes to the skin and developed less fibrosis.

Furthermore, both mouse models demonstrated elevated levels of CD4<sup>+</sup> T-cells in the early phase. This was accompanied with reduced Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) numbers, which underlines a pro-inflammatory phenotype. In addition, monocytic populations in the blood of SSc patients were examined and characterized in comparison to healthy donors. Flow cytometry analysis revealed an increased expression of Siglec 10 in patrolling monocytes. Furthermore, the score of SSc patients correlated with the frequency of CD14<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> inflammatory monocytes.

## Summary

Our study shows that inflammatory monocytes, that are recruited from the spleen and enter tissues via CCR2/CCL2-regulated mechanisms, are crucial drivers of dermal fibrosis development. Interference with the CCR2/CCL2 axis, potentially via aptamers, could be a promising therapeutic avenue for SSc patients.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Kabashima, K., Honda, T., Ginhoux, F. & Egawa, G. The immunological anatomy of the skin. *Nat. Rev. Immunol.* **19**, 19–30 (2019).
2. Nguyen, A. V. & Soulika, A. M. The Dynamics of the Skin's Immune System. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
3. Williams, M., Mildner, A. & Yona, S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity* **49**, 595–613 (2018).
4. van Caam, A., Vonk, M., van den Hoogen, F., van Lent, P. & van der Kraan, P. Unraveling SSc Pathophysiology; The Myofibroblast. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
5. Ando, K., Nakashita, T., Kaneko, N., Takahashi, K. & Motojima, S. Associations between peripheral blood eosinophil counts in patients with systemic sclerosis and disease severity. *SpringerPlus* **5**, (2016).
6. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 958–969 (2008).
7. Murray, P. J. & Wynn, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 723–737 (2011).
8. Wermuth, P. J. & Jimenez, S. A. The significance of macrophage polarization subtypes for animal models of tissue fibrosis and human fibrotic diseases. *Clin. Transl. Med.* **4**, (2015).
9. Williams, M. *et al.* Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 571–578 (2014).
10. Swirski, F. K. *et al.* Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* **325**, 612–616 (2009).
11. Mildner, A. *et al.* Genomic Characterization of Murine Monocytes Reveals C/EBP $\beta$  Transcription Factor Dependence of Ly6C<sup>+</sup> Cells. *Immunity* **46**, 849–862.e7 (2017).
12. Villani, A.-C. *et al.* Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science* **356**, eaah4573 (2017).
13. Menezes, S. *et al.* The Heterogeneity of Ly6Chi Monocytes Controls Their Differentiation into iNOS<sup>+</sup> Macrophages or Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Immunity* **45**, 1205–1218 (2016).
14. Kapellos, T. S. *et al.* Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
15. Kratofil Rachel M., Kubes Paul & Deniset Justin F. Monocyte Conversion During Inflammation and Injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **37**, 35–42 (2017).
16. Ginhoux, F. & Jung, S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 392–404 (2014).
17. Patel, A. A. *et al.* The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *J. Exp. Med.* **214**, 1913–1923 (2017).
18. Carlin, L. M. *et al.* Nr4a1-Dependent Ly6Clow Monocytes Monitor Endothelial Cells and Orchestrate Their Disposal. *Cell* **153**, 362–375 (2013).
19. Raker, V. *et al.* Early inflammatory players in cutaneous fibrosis. *J. Dermatol. Sci.* **87**, 228–235 (2017).
20. Bassler, K., Schulte-Schrepping, J., Warnat-Herresthal, S., Aschenbrenner, A. C. & Schultze, J. L. The Myeloid Cell Compartment—Cell by Cell. *Annu. Rev. Immunol.* **37**, 269–293 (2019).
21. Wynn, T. A., Chawla, A. & Pollard, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* **496**, 445–455 (2013).
22. Yáñez, A. *et al.* Granulocyte-monocyte progenitors and monocyte-dendritic cell progenitors independently produce functionally distinct monocytes. *Immunity* **47**, 890–902.e4 (2017).
23. Williams, M. & Scott, C. L. Does niche competition determine the origin of tissue-resident macrophages? *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 451–460 (2017).
24. Rym Belhareth, J.-L. M. & ge. Macrophage populations and self-renewal: Changing the paradigm. *World J. Immunol.* **5**, 131–141 (2015).
25. Martinez, F. O. & Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* **6**, (2014).
26. Rink, L., Kruse, A. & Haase, H. *Immunologie für Einsteiger*. (Springer Berlin Heidelberg, 2015).
27. Schlitzer, A. *et al.* Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow. *Nat. Immunol.* **16**, 718–728 (2015).
28. Shortman, K. & Liu, Y.-J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 151–161 (2002).
29. Golovina, T. N. & Vonderheide, R. H. Regulatory T cells: overcoming suppression of T-cell immunity. *Cancer J. Sudbury Mass* **16**, 342–347 (2010).
30. Sharabi, A. *et al.* Regulatory T cells in the treatment of disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **17**, 823–844 (2018).
31. Mohr, A., Malhotra, R., Mayer, G., Gorochov, G. & Miyara, M. Human FOXP3<sup>+</sup> T regulatory cell heterogeneity. *Clin. Transl. Immunol.* **7**, e1005 (2018).
32. Zhao, H., Liao, X. & Kang, Y. Tregs: Where We Are and What Comes Next? *Front. Immunol.* **8**, (2017).
33. Akkaya, B. *et al.* Regulatory T cells mediate specific suppression by depleting peptide–MHC class II from dendritic cells. *Nat. Immunol.* **20**, 218–231 (2019).
34. Zhu, Y. P., Thomas, G. D. & Hedrick, C. C. Transcriptional Control of Monocyte Development. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **36**, 1722–1733 (2016).
35. Jakubzick, C. V., Randolph, G. J. & Henson, P. M. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 349–362 (2017).

36. Shi, C. & Pamer, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 762–774 (2011).
37. Murphy, P. M. *et al.* International Union of Pharmacology. XXII. Nomenclature for Chemokine Receptors. *Pharmacol. Rev.* **52**, 145–176 (2000).
38. Griffith, J. W., Sokol, C. L. & Luster, A. D. Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 659–702 (2014).
39. Chen, K. *et al.* Chemokines in homeostasis and diseases. *Cell. Mol. Immunol.* **15**, 324–334 (2018).
40. Abraham, D. J., Krieg, T., Distler, J. & Distler, O. Overview of pathogenesis of systemic sclerosis. *Rheumatology* **48**, iii3–iii7 (2009).
41. Dirschka, T., Hartwig, R. & Oster-Schmidt, C. Klinikleitfaden Dermatologie. <http://shop.elsevier.de/klinikleitfaden-dermatologie-9783437597831.html> (2011).
42. Herold, G. *Innere Medizin 2013*. (Herold, Gerd, 2012).
43. Sticherling, M. Systemische Sklerodermie – die dermatologische Sicht. *JDDG J. Dtsch. Dermatol. Ges.* **17**, 716–729 (2019).
44. Desbois, A. C. & Cacoub, P. Systemic sclerosis: An update in 2016. *Autoimmun. Rev.* **15**, 417–426 (2016).
45. Katsumoto, T. R., Whitfield, M. L. & Connolly, M. K. The Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **6**, 509–537 (2011).
46. Denton, C. P., Black, C. M. & Abraham, D. J. Mechanisms and consequences of fibrosis in systemic sclerosis. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **2**, 134–144 (2006).
47. Wynn, T. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J. Pathol.* **214**, 199–210 (2008).
48. Bhattacharyya, S., Wei, J. & Varga, J. Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities. *Nat. Rev. Rheumatol.* **8**, 42–54 (2011).
49. Thuan, D. T. B. *et al.* A Potential Link Between Oxidative Stress and Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Systemic Sclerosis. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
50. Flox Camacho, Á. *et al.* Transition From Prostacyclin to Bosentan in Five Patients With Severe Pulmonary Hypertension: The Switch Is Possible. *Rev. Esp. Cardiol.* **59**, 737–739 (2006).
51. Hua-Huy, T. & Dinh-Xuan, A. T. Cellular and molecular mechanisms in the pathophysiology of systemic sclerosis. *Pathol. Biol.* **63**, 61–68 (2015).
52. Pattanaik, D., Brown, M., Postlethwaite, B. C. & Postlethwaite, A. E. Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
53. Lu, T. T. Dendritic Cells: Novel Players in Fibrosis and Scleroderma. *Curr. Rheumatol. Rep.* **14**, 30–38 (2011).
54. Beyer, C., Schett, G., Distler, O. & Distler, J. H. W. Animal models of systemic sclerosis: Prospects and limitations. *Arthritis Rheum.* **62**, 2831–2844 (2010).
55. Avouac, J., Elhai, M. & Allanore, Y. Experimental models of dermal fibrosis and systemic sclerosis. *Joint Bone Spine* **80**, 23–28 (2013).
56. Servettaz, A. *et al.* Selective Oxidation of DNA Topoisomerase 1 Induces Systemic Sclerosis in the Mouse. *J. Immunol.* **182**, 5855–5864 (2009).
57. Maria, A. T. J. *et al.* Antifibrotic, Antioxidant, and Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells in HOCl-Induced Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol.* **68**, 1013–1025 (2016).
58. Meng, M. *et al.* The Fibrosis and Immunological Features of Hypochlorous Acid Induced Mouse Model of Systemic Sclerosis. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
59. Maurer, B., Distler, J. H. W. & Distler, O. The Fra-2 transgenic mouse model of systemic sclerosis. *Vascul. Pharmacol.* **58**, 194–201 (2013).
60. Eferl, R. *et al.* Development of pulmonary fibrosis through a pathway involving the transcription factor Fra-2/AP-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 10525–10530 (2008).
61. Ucer0, A. C. *et al.* Fra-2-expressing macrophages promote lung fibrosis. *J. Clin. Invest.* **129**, 3293–3309 (2019).
62. Maaten, L. van der & Hinton, G. Visualizing Data using t-SNE. *J. Mach. Learn. Res.* **9**, 2579–2605 (2008).
63. circize implements and enhances circular visualization in R | Bioinformatics | Oxford Academic. <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/30/19/2811/2422259>.
64. R Development Core Team. *a language and environment for statistical computing: reference index*. (R Foundation for Statistical Computing, 2010).
65. Raker, V. K. *et al.* Myeloid cell populations and fibrogenic parameters in bleomycin- and HOCl-induced fibrosis. *Exp. Dermatol.* n/a-n/a (2016) doi:10.1111/exd.13124.
66. Rensen, S. S. M., Doevendans, P. A. F. M. & van Eys, G. J. J. M. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth. Heart J.* **15**, 100–108 (2007).
67. Teh, Y. C., Ding, J. L., Ng, L. G. & Chong, S. Z. Capturing the Fantastic Voyage of Monocytes Through Time and Space. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
68. Ziegler-Heitbrock, L. *et al.* Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* **116**, e74-80 (2010).
69. Dyer, D. P. *et al.* Chemokine Receptor Redundancy and Specificity Are Context Dependent. *Immunity* **50**, 378-389.e5 (2019).
70. Passlick, B., Flieger, D. & Ziegler-Heitbrock, H. W. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* **74**, 2527–2534 (1989).
71. Paradis, P. & Schiffrin, E. L. CXCL1–CXCR2 lead monocytes to the heart of the matter. *Eur. Heart J.* **39**, 1832–1834 (2018).
72. Kania, G., Rudnik, M. & Distler, O. Involvement of the myeloid cell compartment in fibrogenesis and systemic sclerosis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **15**, 288–302 (2019).

73. Palumbo-Zerr, K. *et al.* Orphan nuclear receptor NR4A1 regulates transforming growth factor- $\beta$  signaling and fibrosis. *Nat. Med.* **21**, 150–158 (2015).
74. Zhan, Y. *et al.* Cytosporone B is an agonist for nuclear orphan receptor Nur77. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 548–556 (2008).
75. Haub, J. *et al.* Intervention of Inflammatory Monocyte Activity Limits Dermal Fibrosis. *J. Invest. Dermatol.* **139**, 2144–2153 (2019).
76. Cho, J. S. *et al.* PDGF-BB Promotes Type I IFN-Dependent Vascular Alterations and Monocyte Recruitment in a Model of Dermal Fibrosis. *PLOS ONE* **11**, e0162758 (2016).
77. Ayers, N. B., Sun, C.-M. & Chen, S.-Y. Transforming growth factor- $\beta$  signaling in systemic sclerosis. *J. Biomed. Res.* **32**, 3–12 (2018).
78. Higashi-Kuwata, N., Makino, T., Inoue, Y., Takeya, M. & Ihn, H. Alternatively activated macrophages (M2 macrophages) in the skin of patient with localized scleroderma. *Exp. Dermatol.* **18**, 727–729 (2009).
79. Adhyatmika, A., Putri, K. S. S., Beljaars, L. & Melgert, B. N. The Elusive Antifibrotic Macrophage. *Front. Med.* **2**, (2015).
80. Laurent, P. *et al.* Innate Immunity in Systemic Sclerosis Fibrosis: Recent Advances. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
81. Sun, C. & Chen, S.-Y. RGC32 Promotes Bleomycin-Induced Systemic Sclerosis in a Murine Disease Model by Modulating Classically Activated Macrophage Function. *J. Immunol.* **200**, 2777–2785 (2018).
82. Maier, C. *et al.* Inhibition of phosphodiesterase 4 (PDE4) reduces dermal fibrosis by interfering with the release of interleukin-6 from M2 macrophages. *Ann. Rheum. Dis.* annrheumdis-2016-210189 (2017) doi:10.1136/annrheumdis-2016-210189.
83. Distler, O. *et al.* Nintedanib for Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease. *N. Engl. J. Med.* **380**, 2518–2528 (2019).
84. Birnhuber, A. *et al.* IL-1 receptor blockade skews inflammation towards Th2 in a mouse model of systemic sclerosis. *Eur. Respir. J.* **54**, (2019).
85. Birnhuber, A., Biasin, V., Schnoegl, D., Marsh, L. M. & Kwapiszewska, G. Transcription factor Fra-2 and its emerging role in matrix deposition, proliferation and inflammation in chronic lung diseases. *Cell. Signal.* **64**, 109408 (2019).
86. Ciecomska, M. *et al.* Histone Demethylation and Toll-like Receptor 8-Dependent Cross-Talk in Monocytes Promotes Transdifferentiation of Fibroblasts in Systemic Sclerosis Via Fra-2. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **68**, 1493–1504 (2016).
87. Binai, N., O'Reilly, S., Griffiths, B., van Laar, J. M. & Hügler, T. Differentiation Potential of CD14+ Monocytes into Myofibroblasts in Patients with Systemic Sclerosis. *PLoS ONE* **7**, (2012).
88. Striegler, J. Funktionelle Charakterisierung von Diphtherietoxinrezeptor-transgenen Mäusen zur konditionalen Depletion von dendritischen Zellen. <http://archiv.ub.uni-heidelberg.de/volltextserver/15754/> (2013).
89. Gibbons, M. A. *et al.* Ly6Chi monocytes direct alternatively activated profibrotic macrophage regulation of lung fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **184**, 569–581 (2011).
90. Baeck, C. *et al.* Pharmacological inhibition of the chemokine C-C motif chemokine ligand 2 (monocyte chemoattractant protein 1) accelerates liver fibrosis regression by suppressing Ly-6C+ macrophage infiltration in mice. *Hepatology* **59**, 1060–1072 (2014).
91. Mewhort, H. E. M. *et al.* Monocytes increase human cardiac myofibroblast-mediated extracellular matrix remodeling through TGF- $\beta$ 1. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **310**, H716-724 (2016).
92. Bartelds GM, Krieckaert CM, Nurmohamed MT & et al. DEvelopment of antidrug antibodies against adalimumab and association with disease activity and treatment failure during long-term follow-up. *JAMA* **305**, 1460–1468 (2011).
93. Jung, H., Mithal, D. S., Park, J. E. & Miller, R. J. Localized CCR2 Activation in the Bone Marrow Niche Mobilizes Monocytes by Desensitizing CXCR4. *PLOS ONE* **10**, e0128387 (2015).
94. Kaikita, K. *et al.* Targeted deletion of CC chemokine receptor 2 attenuates left ventricular remodeling after experimental myocardial infarction. *Am. J. Pathol.* **165**, 439–447 (2004).
95. Dominguez-Villar, M. & Hafler, D. A. Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nat. Immunol.* **19**, 665–673 (2018).
96. Hasegawa, M., Fujimoto, M., Kikuchi, K. & Takehara, K. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* **24**, 328–332 (1997).
97. Panduro, M., Benoist, C. & Mathis, D. Tissue Tregs. *Annu. Rev. Immunol.* **34**, 609–633 (2016).
98. Radstake, T. R. D. J. *et al.* Increased frequency and compromised function of T regulatory cells in systemic sclerosis (SSc) is related to a diminished CD69 and TGFbeta expression. *PLoS One* **4**, e5981 (2009).
99. Frantz, C., Auffray, C., Avouac, J. & Allanore, Y. Regulatory T Cells in Systemic Sclerosis. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
100. Slobodin, G. & Rimar, D. Regulatory T Cells in Systemic Sclerosis: a Comprehensive Review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **52**, 194–201 (2017).
101. Parel, Y. *et al.* Presence of CD4+CD8+ double-positive T cells with very high interleukin-4 production potential in lesional skin of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **56**, 3459–3467 (2007).
102. Foley, J. F. Highlight: IL-2 receptor signaling. *Sci. Signal.* **10**, (2017).
103. Malek, T. R. & Castro, I. Interleukin-2 Receptor Signaling: At the Interface between Tolerance and Immunity. *Immunity* **33**, 153–165 (2010).
104. Spee-Mayer, C. von *et al.* Low-dose interleukin-2 selectively corrects regulatory T cell defects in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 1407–1415 (2016).

105. Becker, M. O. *et al.* The monoclonal anti-CD25 antibody basiliximab for the treatment of progressive systemic sclerosis: an open-label study. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, 1340–1341 (2011).
106. Allanore, Y., Matucci-Cerinic, M. & Distler, O. Treatment of systemic sclerosis: is there any hope for the future? *RMD Open* **2**, (2016).
107. Ford, L. B. *et al.* Characterization of conventional and atypical receptors for the chemokine CCL2 on mouse leukocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **193**, 400–411 (2014).
108. Bandinelli, F. *et al.* CCL2, CCL3 and CCL5 chemokines in systemic sclerosis: the correlation with SSc clinical features and the effect of prostaglandin E1 treatment. *Clin. Exp. Rheumatol.* **30**, S44-49 (2012).
109. Hasegawa, M. Biomarkers in systemic sclerosis: Their potential to predict clinical courses. *J. Dermatol.* **43**, 29–38 (2016).
110. Hinchcliff, M. *et al.* Mycophenolate Mofetil Treatment of Systemic Sclerosis Reduces Myeloid Cell Numbers and Attenuates the Inflammatory Gene Signature in Skin. *J. Invest. Dermatol.* **138**, 1301–1310 (2018).
111. Kawashiri, S. *et al.* Association of serum levels of fibrosis-related biomarkers with disease activity in patients with IgG4-related disease. *Arthritis Res. Ther.* **20**, (2018).
112. Distler, J. H. W., Akhmetshina, A., Schett, G. & Distler, O. Monocyte chemoattractant proteins in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **48**, 98–103 (2009).
113. Menne, J. *et al.* C-C motif-ligand 2 inhibition with emapticap pegol (NOX-E36) in type 2 diabetic patients with albuminuria. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **32**, 307–315 (2017).
114. Vergunst, C. E. *et al.* Modulation of CCR2 in rheumatoid arthritis: A double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Arthritis Rheum.* **58**, 1931–1939 (2008).
115. Lee, R. *et al.* Enhanced chemokine-receptor expression, function, and signaling in healthy African American and scleroderma-patient monocytes are regulated by caveolin-1. *Fibrogenesis Tissue Repair* **8**, (2015).
116. Trombetta, A. C. *et al.* A circulating cell population showing both M1 and M2 monocyte/macrophage surface markers characterizes systemic sclerosis patients with lung involvement. *Respir. Res.* **19**, 186 (2018).
117. Dutertre, C.-A. *et al.* Single-Cell Analysis of Human Mononuclear Phagocytes Reveals Subset-Defining Markers and Identifies Circulating Inflammatory Dendritic Cells. *Immunity* **51**, 573-589.e8 (2019).
118. Macauley, M. S., Crocker, P. R. & Paulson, J. C. Siglec regulation of immune cell function in disease. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 653–666 (2014).
119. Roh, J. S. & Sohn, D. H. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw.* **18**, (2018).
120. Flores, R. *et al.* Siglec genes confer resistance to systemic lupus erythematosus in humans and mice. *Cell. Mol. Immunol.* **16**, 154–164 (2019).
121. Urbonaviciute, V. *et al.* Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1–nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE. *J. Exp. Med.* **205**, 3007–3018 (2008).
122. Ribezzo, F., Shiloh, Y. & Schumacher, B. Systemic DNA damage responses in aging and diseases. *Semin. Cancer Biol.* **37–38**, 26–35 (2016).
123. Rice, L. M. *et al.* Fresolimumab treatment decreases biomarkers and improves clinical symptoms in systemic sclerosis patients. *J. Clin. Invest.* **125**, 2795–2807 (2015).
124. Walton, K. L., Johnson, K. E. & Harrison, C. A. Targeting TGF- $\beta$  Mediated SMAD Signaling for the Prevention of Fibrosis. *Front. Pharmacol.* **8**, (2017).
125. Zhou, F. *et al.* Nuclear receptor NR4A1 promotes breast cancer invasion and metastasis by activating TGF- $\beta$  signalling. *Nat. Commun.* **5**, 3388 (2014).
126. Liebmann, M. *et al.* Nur77 serves as a molecular brake of the metabolic switch during T cell activation to restrict autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E8017–E8026 (2018).
127. Rongvaux, A. *et al.* Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model. *Nat. Biotechnol.* **32**, 364–372 (2014).

## II. Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1: Humane und Maus Monozyten im Überblick. _____   | 4  |
| Abbildung 2: Differenzierung und Eigenschaften von Makrophagen. _____  | 6  |
| Abbildung 3: Monozytenrekrutierung im steady state versus inflammatorischen Bedingungen. _____   | 9  |
| Abbildung 4: Pathogenese der Systemischen Sklerose. _____  | 14 |
| Abbildung 5: Schlüsselprozesse der Systemischen Sklerose in verschiedenen Mausmodellen. _____  | 15 |
| Abbildung 6: Transgenes Konstrukt zur ektopischen Expression von fra-2 _____   | 25 |
| Abbildung 7: Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls. _____  | 26 |
| Abbildung 8: Depletion CD11b <sup>+</sup> /Ly6C <sup>+</sup> Zellen im HOCl-Modell. _____  | 36 |
| Abbildung 9: Depletionseffizienz. _____  | 37 |
| Abbildung 10: Immunhistochemische Analyse der Haut zur Bestimmung von $\alpha$ -SMA <sup>+</sup> -Zellen nach Depletion myeloider Zellen im HOCl-Modell. _____ | 38 |
| Abbildung 11: Reduktion der Hautfibrose nach Depletion CD11b <sup>+</sup> /Ly6C <sup>+</sup> myeloider Zellen im HOCl-Modell. _____                            | 39 |
| Abbildung 12: Durchflusszytometrische Analyse des dermalen Infiltrats. _____   | 41 |
| Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analysen des dermalen Infiltrats nach Depletion myeloider Zellen im HOCl-Modell. _____                                   | 43 |
| Abbildung 14: Expression der Gene CCR2 (A,D), CD206 (B,E) und TNF- $\alpha$ (C,F) in rasierter Rückenhaul an Tag 7 und 28 von HOCl-Tieren. _____               | 45 |
| Abbildung 15: Monozytenrekrutierung in CCR2 KO Mäusen nach HOCl-Behandlung über vier Wochen. _____   | 47 |
| Abbildung 16: Histologische Analysen von fibrotischer Haut in der CCR2 KO Maus nach 28 tägiger HOCl Behandlung. _____  | 49 |
| Abbildung 17: Kinetik der dermalen Infiltration bei Fra-2 Mäusen. _____  | 50 |
| Abbildung 18: Bestimmung des Kollagengehalts der Haut in Fra-2 Tieren. _____   | 51 |
| Abbildung 19: Schematische Darstellung zum Injektionsschema im induzierten und spontanen Mausmodell. _____   | 52 |
| Abbildung 20: Gating strategie nach mNOX-E36 Behandlung. _____   | 53 |
| Abbildung 21: Infiltration HOCl behandelter Haut nach mNOX-E36 Behandlung. _____   | 54 |
| Abbildung 22: Infiltrat-Charakterisierung nach mNOX-E36 Behandlung in der Fra-2 Maus Haut. _____   | 55 |
| Abbildung 23: Bestimmung des Kollagengehalts der Haut im induzierten Mausmodell nach mNOX Gabe. _____  | 56 |
| Abbildung 24: Bestimmung des Kollagengehalts in Fra-2 Haut nach mNOX-E36 Behandlung. _____   | 57 |
| Abbildung 25: Durchflusszytometrische Analyse des dermalen Infiltrats in splenektomierten Mäusen. _____  | 58 |
| Abbildung 26: Bestimmung des Kollagengehalts in splenektomierten Mäusen. _____   | 59 |
| Abbildung 27: Durchflusszytometrische Untersuchungen der T-Zellen im spontanen und induzierten Mausmodell. _____   | 61 |
| Abbildung 28: Durchflusszytometrische Analysen von Tregs in der Rückenhaul. _____  | 62 |
| Abbildung 29: Durchflusszytometrische Analysen von Monozyten im Vollblut. _____  | 67 |

*Abbildung 30: Durchflusszytometrische Analysen im Vollblut von SSc-Patienten und gesunden Spendern.* \_\_\_\_\_ 68

*Abbildung 31: Korrelationsanalysen im Vollblut von SSC Patienten.* \_\_\_\_\_ 70

### **III. Tabellensverzeichnis**

*Tabelle 1: Charakterisierung des Untersuchungskollektivs.* \_\_\_\_\_ 63

*Tabelle 2: Klinische Symptome und Systemische Beteiligung.* \_\_\_\_\_ 65

*Tabelle 3: Charakterisierung von gesunden Spendern.* \_\_\_\_\_ 65

*Tabelle 4: Kriterien der systemischen Sklerodermie.* \_\_\_\_\_ 69

## IV. Abkürzungen

|                          |   |
|--------------------------|---|
| (D)                      | Deutschland                                     |
| µm                       | Mikrometer                                      |
| °C                       | Grad Celsius                                    |
| Abb.                     | Abbildung                                       |
| ACK                      | Ammonium-Chloride-Potassium                     |
| APZ                      | Antigenpräsentierende Zelle                     |
| BSA                      | Bovine Serum Albumin                            |
| bzw.                     | Beziehungsweise                                 |
| cAMP                     | Cyclisches Adenosinmonophosphat                 |
| CCL                      | CC-Chemokin ligand                              |
| CCR                      | C-C chemokine receptor type                     |
| CD                       | cluster of differentiation                      |
| cDNA                     | <i>complementary</i> DNA                        |
| CDP                      | dendritischen Zellvorläufern                    |
| c-Kit                    | Stammzellwachstumsfaktor-Rezeptor               |
| cMoPs                    | Monozyten-Vorläuferzellen                       |
| CSF1R                    | Colony Stimulating Factor 1 Receptor            |
| CSF3R                    | Colony Stimulating Factor 3 Receptor            |
| CSFR1                    | Macrophage-colony stimulating factor receptor 1 |
| CTLA                     | zytotoxische T-Lymphozyten Antigen              |
| CTSW                     | Cathepsin W                                     |
| CXCR                     | CXC-Motiv-Chemokinrezeptor                      |
| DC                       | dendritische Zelle                              |
| DT                       | Diphtherietoxin                                 |
| DNA                      | Desoxyribonukleinsäure                          |
| ECM                      | extrazellulären Matrixproteinen                 |
| FACS                     | fluorescence activated cell sorting             |
| FCS                      | Fetales Kälberserum                             |
| FOXP3                    | forkhead box P3                                 |
| Fra-2                    | fos-related antigen 2                           |
| FSC                      | <i>Forward Scatter</i>                          |
| g                        | Gramm   |
| GCPR                     | G-Protein-gekoppelte Chemokinrezeptoren         |
| GDP                      | Guanosindiphosphat                              |
| GFP                      | grün fluoreszierende Protein                    |
| GNLY                     | Granulysin                                      |
| GTP                      | Guanosintriphosphat                             |
| H <sub>2</sub> O (dest.) | (destilliertes) Wasser                          |
| HB                       | Hank's Balanced Salt Solution                   |
| HD                       | <i>Healthy Donor</i>                            |
| HOCl                     | Hypochlorsäure                                  |

## Abkürzungen

|            |   |
|------------|---|
| HSC        | hämatopoetischen Stammzellen                                |
| i.d.       | intradermal   |
| i.p.       | intraperitoneal   |
| IFN        | Interferone   |
| IL         | Interleukin   |
| KO         | Kontrolle   |
| L          | Liter   |
| LPS        | Lipopolysaccharid   |
| MCP        | Monozyten-chemotaktisches Protein                           |
| M-CSF      | macrophage colonystimulating Factor                         |
| MDP        | Makrophagen- und Dendritischen -Vorläuferzellen             |
| mg         | Milligramm  |
| MHC        | <i>Major Histokompatibility Complex</i>                     |
| min        | minute  |
| ml         | Milliliter  |
| mM         | Millimol pro Liter  |
| mm         | Millimeter  |
| MMDP       | Makrophagen-Monozyten-Dendritischen-Zell-Vorläufer          |
| MMPS       | Metalloproteasen  |
| mNOX-E36   | <i>emapticap pegol</i>                                      |
| moDCs      | <i>monocyte derived DCs</i>                                 |
| MPO        | Myeloperoxidase   |
| MPS        | mononukleär-phagozytärem System                             |
| MXD1       | MAX Dimerization Protein 1                                  |
| NK-Zellen  | natürliche Killerzellen                                     |
| NLD        | Niederlande   |
| Nr4a1      | Orphan-Nuklear-Rezeptor                                     |
| OÖ         | Oberösterreich  |
| PBS        | phosphate buffered saline                                   |
| pDC        | plasmazytoiden DC   |
| PKC        | Proteinkinase C   |
| pmol       | Pikomol   |
| PRF1       | Perforin 1  |
| PRR        | <i>pattern recognition receptors</i>                        |
| qPCR       | Polymerasekettenreaktion                                    |
| RNA        | Ribonukleinsäure  |
| ROS        | reaktive Sauerstoffspezies                                  |
| RT         | Raumtemperatur  |
| <i>SLE</i> | <i>Systemischer Lupus erythematoses</i>                     |
| SSC        | <i>Side Scatter</i>   |
| SSc        | Systemische Sklerose oder systemische Sklerodermie          |
| TGF-β      | Tumor Growth Factor beta; Transformierender Wachstumsfaktor |
| TLR        | Toll-like-Rezeptoren  |

## Abkürzungen

|               |  |
|---------------|--|
| TNF           | Tumor-Nekrose Faktor                               |
| TNF           | Tumornekrosefaktor                                 |
| Tregs         | regulatorische T-Zellen                            |
| TREM1         | Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cells 1   |
| t-SNE         | <i>t-distributed stochastic neighbor embedding</i> |
| US            | United States                                      |
| VEGF          | Vascular Endothelial Growth Factor                 |
| VNN2          | Vanin 2  |
| WT            | Wildtyp  |
| x g           | Erdbeschleunigung                                  |
| z.B.          | zum Beispiel                                       |
| ZBTB46        | Zinc Finger and BTB Domain Containing 46           |
| $\alpha$ -SMA | <i>Alpha Smooth- Muscle-Actin</i>                  |
| $\mu$ g       | Mikrogramm   |
| $\mu$ l       | Mikroliter   |
| $\mu$ M       | Mikromolar   |