

Aus der Klinik für Rheumatologie und dem Hiller Forschungszentrum
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Jörg H.W. Distler

**Charakterisierung von Zellpopulationen in der primären Herzbeteiligung bei
Systemischer Sklerose im Vergleich zu anderen autoimmunen und idiopathischen
Formen (nicht-viraler) Myokarditis mittels Imaging Mass Cytometry (Spatial
Proteomics)**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Ayla Nadja Stütz
2025

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez.:

Dekan/in: Herr Univ. Prof. Dr. med. Nikolaj Klöckner

Erstgutachter: Herr Univ. Prof. Dr. med. Jörg H. W. Distler

Zweitgutachter: Herr Univ. Prof. Dr. med. Amin Polzin

Für meinen Vater
und für Wolfgang

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Als Poster akzeptiert für den European Alliance of Associations for Rheumatology (EULAR) Kongress 2025

sowie den American College of Rheumatology (ACR) Kongress 2025

“Spatial Proteomic-based Phenotyping of Fibroblast Populations and their Microenvironment in Systemic Sclerosis Primary Heart Involvement”

Zusammenfassung

Wissenschaftlicher Hintergrund: Die Systemische Sklerose (SSc) ist die Erkrankung mit der höchsten krankheitsbedingten Mortalität unter den rheumatologischen Autoimmunerkrankungen. Die primäre Herzbeteiligung bei SSc (SSc-pHI) ist eine der Haupttodesursachen bei der SSc. Histologisch zeigt sich in der SSc-pHI eine, im Vergleich zu anderen autoimmunen (a-HI) und idiopathischen Formen (i-HI) nicht-viraler, entzündlicher Myokarderkrankungen, ausgeprägtere Fibrose, welche klinisch mit einem schlechteren Outcome korreliert. Jedoch sind die zellulären und die molekularen Pathomechanismen der SSc-pHI derzeit größtenteils unbekannt. Die myokardiale Fibrose, als Endstadium jeglicher kardialen Schädigung, führt zur irreversiblen Beeinträchtigung der strukturellen und funktionellen Integrität des Herzens und ist eines der drängendsten ungelösten Probleme der modernen Kardiologie.

Ziel der Arbeit/Methodik: Die Intention des dargestellten Projektes war die erstmalige, tiefergehende explorative Analyse der Stroma- und Immunzellsubpopulationen bei der SSc-pHI, im direkten Vergleich zu a-HI und i-HI, mittels Imaging Mass Cytometry (IMC). Untersucht wurden Formalin-fixierte endomyokardiale Biopsien (EMBs) des rechten Ventrikels von zehn SSc-pHI, sieben a-HI und neun i-HI-Patienten (nach Ausschluss einer viralen Myokarditis) mit einem hochdimensionalen IMC-panel.

Ergebnisse: Es konnten 15 Immunzell-Subpopulationen sowie 21 Nicht-Immunzell-Subpopulationen identifiziert werden. Erstmals wurden Unterschiede in der Frequenz der Immunzell-Subpopulationen im Myokard gefunden, welche die SSc-pHI von anderen (autoimmun-) entzündlichen Myokarderkrankungen (mit weniger aggressiv verlaufender Myokardfibrose) abhebt. So fällt in der SSc-pHI u.a. eine höhere Prävalenz von CD163⁺ M2 Makrophagen sowie CD68⁺ Mastzellen auf. Die Infiltrate in der a-HI werden hingegen v.a. von (aktivierten) Lymphozyten sowie HLA-DR- Makrophagen dominiert. Auch die Stromazell-Nische in der SSc-pHI zeigt spezifische Unterschiede, so wird sie u.a. durch die Anwesenheit von CD34⁺ Stromazellen, SOX9⁺ Stromazellen, THY1⁺/ADAM12⁺/FSP1⁺ Stromazellen sowie PI16^{high}/COL1A1⁺/ POSTN⁺ Stromazellen geprägt, während sich in der a-HI u.a. POSTN⁺/FAP^{high} Stromazellen, PI16⁺/COL1A1⁺/ POSTN⁺ Stromazellen sowie α -SMA⁺ Myofibroblasten hochreguliert darstellten. Die i-HI grenzt sich mit einem hohen Anteil undefinierter Zellen deutlich von den anderen Entitäten ab.

Schlussfolgerungen: Durch die explorative Analyse mittels IMC konnten erstmals Unterschiede in der Frequenz verschiedener Zellen zwischen SSc-pHI sowie a-HI und i-HI gefunden werden. In einem Folgeprojekt sollen die räumlichen Zellbeziehungen näher analysiert sowie die Ergebnisse dieser Studie validiert und im Hinblick auf ihre translationale Relevanz weiter untersucht werden.

Summary

Scientific Background: Systemic sclerosis (SSc) is the disease with the highest disease-related mortality of all autoimmune rheumatologic diseases. Primary cardiac involvement in SSc (SSc-pHI) is one of the leading causes of death in SSc. Histologically, SSc-pHI exhibits more pronounced fibrosis compared to other autoimmune (a-HI) and idiopathic (i-HI) forms of non-viral inflammatory myocardial diseases, which correlates clinically with a worse outcome. However, the cellular and molecular pathomechanisms of SSc-pHI remain largely unknown. Myocardial fibrosis, as the end stage of any severe cardiac damage, leads to irreversible impairment of the structural and functional integrity of the heart and represents one of the most pressing unresolved problems in modern cardiology.

Objective/Methodology: The aim of this project was to perform an in-depth exploratory analysis of stromal and immune cell subpopulations in SSc-pHI, in direct comparison to a-HI and i-HI, using imaging mass cytometry (IMC). Formalin-fixed endomyocardial biopsies (EMBs) from the right ventricle of 10 SSc-pHI, 7 a-HI, and 9 i-HI patients (after exclusion of viral myocarditis) were analysed using a high-dimensional IMC panel.

Results: A total of 15 immune cell subpopulations and 21 non-immune cell subpopulations were identified. For the first time, differences in the frequency of immune cell subpopulations in the myocardium were observed, distinguishing SSc-pHI from other (autoimmune) inflammatory myocardial diseases (which typically have a less aggressive myocardial fibrosis progression). Notably, SSc-pHI showed a higher prevalence of CD163⁺ M2 macrophages and CD68⁺ mast cells. In contrast, the infiltrates in a-HI were predominantly composed of (activated) lymphocytes and HLA-DR-macrophages. The stromal cell niche in SSc-pHI also exhibited specific differences, characterized by the presence of CD34⁺ stromal cells, SOX9⁺ stromal cells, THY1⁺/ADAM12⁺/FSP1⁺ stromal cells, and PI16^{high}/COL1A1⁺/ POSTN⁺ stromal cells. Meanwhile, a-HI showed an upregulation of POSTN⁺/FAP^{high} stromal cells, PI16⁺/COL1A1⁺/ POSTN⁺ stromal cells, and α -SMA⁺ myofibroblasts. The i-HI group was distinct from the other entities due to a high proportion of undefined cells.

Conclusions:

The exploratory IMC analysis enabled demonstration of differences in the frequency of various cell (sub)populations between SSc-pHI, a-HI, and i-HI. In a follow-up project, spatial cell relationships will be analysed in detail, and the findings of this study will be validated and further investigated with regard to their translational relevance.

In der vorliegenden Arbeit wurde auf die Verwendung von Gender*sternchen, Gender_gap etc. aus Gründen der Lesbarkeit und zur Fokussierung auf den wissenschaftlichen Inhalt bewusst verzichtet. Dieser Entscheidung liegt keine grundsätzliche politische Grundhaltung gegen eine genderneutrale Sprache zu Grunde. Das generische Maskulinum schließt in der hier vorliegenden Arbeit selbstverständlich und ausdrücklich alle Geschlechter ein.

Abkürzungsverzeichnis

ACR/EULAR	American College of Rheumatology/ European Alliance of Associations for Rheumatology
ADAM12	<i>ADAM Metallopeptidase Domain 12</i>
AHA	Anti-Herz-Autoantikörper
a-HI	(engl.: <i>autoimmune heart involvement</i>) Herzbeteiligung im Rahmen anderer Autoimmunerkrankungen aus dem Formenkreis der Kollagenosen (nicht SSc)
AICD	Automatischer implantierbarer Cardioverter/Defibrillator
AIDA	Anti- <i>Intercalated disc</i> - Autoantikörper
Ak	Antikörper
ANA	Antinukleäre Autoantikörper
Anti-CA/B	Anti-Centromer A/ B-Autoantikörper
Anti-RNAPIII	Anti-RNA-Polymerase III-Autoantikörper
Anti-Scl70	Anti-Topoisomerase I-Autoantikörper
α-SMA (ACTA)	<i>alpha smooth muscle actin</i> (=Actin Alpha 2)
AZA	Azathioprin
CD	<i>Cluster of Differentiation protein</i>
CD3	<i>CD3 Molecule</i>
CD4	<i>CD4 Molecule</i>
CD8A	<i>CD8A Molecule</i>
CD14	<i>CD14 Molecule</i>
CD20 (MS4A1)	<i>CD20 molecule</i> (=Membrane Spanning 4-Domains A1)
CD31 (PECAM1)	<i>CD31 molecule</i> (=Platelet and Endothelial Cell Adhesion Molecule 1)
CD34	<i>CD34 Molecule</i>
CD45 (PTPRC)	<i>CD45 molecule</i> (=Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type C), Pan-L Panleukozyten Marker
CD68	<i>CD68 Molecule</i>
CD86	<i>CD86 Molecule</i>
CD163	<i>CD163 Scavenger Receptor</i>
COL1A1	<i>Collagen Type I Alpha 1 Chain</i>
CT	Computertomographie
CYC	Cyclophosphamid
DNA	(engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>), dt. Desoxyribonukleinsäure
dcSSc	(engl. <i>diffuse cutaneous SSc</i>), dt. diffuse-kutane SSc
ECM	(engl. <i>extracellular matrix</i>), dt. extrazelluläre Matrix
ESC	European Society of Cardiology

EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
EMB	endomyokardiale Biopsie
EUSTAR	<i>European Scleroderma Trials and Research group</i>
FAP	<i>Fibroblast Activation Protein Alpha</i>
FFPE	(engl. <i>Formalin-Fixed Paraffin-Embedded tissue</i>), dt. Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeproben
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
GC	(engl. <i>Glucocorticoide</i>), Glukokortikoide
HFpEF	(engl.: <i>heart failure with preserved ejection fraction</i>), Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer Pumpfunktion
HFrEF	(engl.: <i>heart failure with reduced ejection fraction</i>), Herzinsuffizienz mit reduzierter linksventrikulärer Pumpfunktion
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HLA-DR	<i>Major Histocompatibility Complex Class II, DR Beta 1</i>
hsTropT	hoch-sensitives Troponin T
IF	Immunfluoreszenz Färbung
i-HI	(engl.: <i>idiopathic heart involvement</i>) idiopathische (nicht virale) Myokarditis ohne Anhalt auf eine systemische Autoimmunerkrankung
IHC	Immunhistochemische Färbung
IL	Interleukine z.B. IL 6, IL4, IL13
ILD	(engl. <i>interstitial lung disease</i>), dt. interstitielle Lungenerkrankung
IMC	(engl. <i>Imaging Mass Cytometry</i>), dt. bildgebende Massenzytometrie
JAK/STAT	<i>Janus-Kinase /Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
KHK	koronare Herzerkrankung
LGE	(engl. <i>Late Gadolinium Enhancement</i>) späte Gadolinium Anreicherung
lcSSc	(engl. <i>limited cutaneous SSc</i>), dt. limitiert-kutane SSc
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MMF	Myocophenolat Mofetil
MMPs	Matrix Metalloproteinasen
MK2	<i>Mitogen-activated protein kinase 2</i>
mRSS	modifizierter Rodnan Skin Score
MRT	Magnetresonanztomographie
MTX	Methotrexat
NT-proBNP	N-terminales pro-B-Typ natriuretisches Peptid
PAH	Pulmonalarterielle Hypertonie
PCR	(engl. <i>polymerase chain reaction</i>), dt. Polymerase Kettenreaktion
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PDGFRA	<i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha</i>
PDGFRB	<i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor Beta</i>
PDPN	Podoplanin
PI3K/AKT/mTOR	Phosphatidylinositol-3-Kinase/ Protein Kinase B/ <i>mechanistic target of Rapamycin</i>
PI16	<i>Peptidase Inhibitor 16</i>
POSTN	Periostin
ROIs	(engl. <i>regions of interest</i>), definierte zu abladierende Areale während IMC-Messung

RTX	Rituximab
sc-RNA-Seq	single-cell RNA Sequenzierung
Smad3	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 3</i>
SOX9	<i>SRY-Box Transcription Factor 9</i>
spe	<i>spatial experiment object</i>
SSc	(engl. <i>systemic sclerosis</i>) systemische Sklerose
SSc-pHI	(engl. <i>SSc primary Heart Involvement</i>), primäre Herzbeteiligung bei SSc
TCF21	<i>Transcription Factor 21</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
THY1(CD90)	<i>Thy-1 Cell Surface Antigen (=CD90 molecule)</i>
TIMPs	(engl. <i>tissue inhibitors of MMPs</i>), dt. Gewebeinhibitoren von MMPs
TNNT2	<i>Troponin T Type 2 (Cardiac)</i>
TOC	Tocilizumab
TPSAB1	<i>Tryptase Alpha/Beta 1</i>
t-SNE	<i>t-distributed stochastic neighbor embedding</i>
TTE	transthorakale Echokardiographie
UMAP	<i>uniform manifold approximation and projection</i>
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
VSMCs	(engl. <i>Vascular smooth muscle cells</i>) vaskuläre glatte Muskelzellen
VWF	Von-Willebrand-Faktor
Wnt	<i>Wingless/Integrated</i>
WSF/HFA	World Scleroderma Foundation/ Heart Failure Association
YAP/TAZ	<i>Yes1 Associated Transcriptional Regulator/ Tafazzin</i>
ZEB1	<i>Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1</i>

Inhaltsverzeichnis.

1. Einleitung	1
1.1. Systemische Sklerose (SSc).....	1
1.1.1. Definition und historische Perspektive der SSc.....	1
1.1.2. Epidemiologie der SSc.....	1
1.1.3. Ätiologie der SSc	2
1.1.4. Pathogenese der SSc.....	3
1.1.5. Klinische Aspekte der SSc.....	10
1.2. Primäre Herzbeteiligung bei SSc (SSc-pHI).....	15
1.2.1. Definition der SSc-pHI und historische Einordnung.....	15
1.2.2. Epidemiologie der SSc-pHI.....	16
1.2.3. Klinische Aspekte der SSc-pHI	17
1.2.4. Histopathologie und Pathophysiologie der SSc-pHI	24
1.3. Hintergrund: allgemeine kardiale Pathologie.....	27
1.3.1. Myokarditis – Inflammation des Herzmuskels	27
1.3.2. Kardiale Fibrose.....	29
1.4. Zielsetzung der Arbeit.....	32
2. Material und Methoden	34
2.1. Patienten: Gewebeproben und klinische Charakteristik.....	34
2.1.1. Gewebeproben.....	34
2.1.2. Klinische Charakteristika	35
2.2. Imaging Mass Cytometry (IMC)	36
2.2.1. Einführung Technik.....	36
2.2.2. Panel Design	38
2.2.3. IMC „Färbung“ des Zielgewebes.....	46
2.2.4. IMC Messung.....	46
2.2.5. IMC Analyse	47
2.3 Verfassung der Dissertationsschrift und Erstellung von Abbildungen.....	62
3. Ergebnisteil.....	63
3.1. Hypothese und Idee des Projektes	63
3.2. Zellcluster.....	64
3.2.1. CD45+ Immunzell-Cluster	64

3.2.2. CD45- Nicht-Immunzell-Cluster.....	68
3.3. Vergleichende Analyse der Zell-Cluster zwischen verschiedenen Krankheitsentitäten.....	73
3.3.1. Prozentualer Vergleich der CD45 ⁺ und CD45 ⁻ Zellen.....	73
3.3.2. Vergleich der Zellcluster zwischen den Krankheitsentitäten	73
3.3.3 Detaillierte vergleichende Betrachtung der (CD45 ⁺) Immunzell-Cluster.	76
3.3.4. Vergleichende Betrachtung der CD45- Nicht Immunzell-Cluster	78
3.3.5. Patientenspezifische Unterschiede in der Clusterhäufigkeit	81
4. Diskussion der Ergebnisse	83
4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse in Hinblick auf die gestellte Forschungsfrage	83
4.2. Limitationen der Studie.....	83
4.3. Wissenschaftliche Diskussion der Ergebnisse.....	85
4.3.1. Immunzellen in der SSc-pHI (im Vergleich zur a-HI)	85
4.3.2. Stromazellen in der SSc-pHI (im Vergleich zur a-HI).....	89
4.4. Outlook	98
Abbildungsverzeichnis.....	100
Tabellenverzeichnis	101
Referenzen.....	102

1. Einleitung

1.1. Systemische Sklerose (SSc)

1.1.1. Definition und historische Perspektive der SSc

Bei der systemischen Sklerose (*engl. systemic sclerosis*, SSc) handelt es sich um eine rheumatische Erkrankung aus dem Formenkreis der Kollagenosen. Während die Klinik anderer Kollagenosen vorrangig durch die autoimmunbedingte Entzündung und den konsekutiven Gewebeschaden geprägt ist, wird die SSc in erster Linie durch den Prozess der zunehmenden Fibrosierung von Haut und inneren Organen und die dadurch folgenden funktionellen Einschränkungen charakterisiert. Die klinische Präsentation der SSc ist sehr heterogen und der Verlauf der Erkrankung schwer vorherzusagen. Klassischerweise wird, anhand des Ausmaßes der Hautfibrose eine diffus-kutane Verlaufsform (*engl. diffuse cutaneous SSc*, dcSSc) von der limitiert-kutanen SSc (*engl. limited cutaneous SSc*, lcSSc) und einer, selten vorkommenden, SSc sine scleroderma (also ohne klinisch detektierbare Hautbeteiligung) unterschieden. Daneben gibt es Fälle undifferenzierter Kollagenosen, welche neben der Diagnose der SSc auch die Klassifikationskriterien für andere rheumatologische Erkrankungen erfüllen.¹

Die ersten dokumentierten Berichte über Fälle von „Sklerodermie“, stammen aus der Mitte des 18. Jahrhunderts. Ob es sich bei den Berichten aus heutiger Sicht tatsächlich um Fälle von SSc oder um kutane Differenzialdiagnosen wie z.B. dem Skleromyxödem handelte, lässt sich retrospektiv nicht mit Gewissheit klären.² Die charakteristische systemische Natur der Erkrankung, mit dem Auftreten von fibrotischen Veränderungen in verschiedenen Organsystemen wurde in jedem Fall erst deutlich später korrekt erfasst. Die möglicherweise erste umfangreiche Beschreibung der SSc, inklusive der charakteristischen Organbeteiligungen, stammt von dem Chirurgen Dr. Robert H. Goetz, welcher seine Beobachtungen 1945 in seinem Aufsatz „Pathology of Progressive Systemic Sclerosis (Scleroderma)“ dokumentierte und damit auch den Begriff der „Systemischen Sklerose“ prägte.³

1.1.2. Epidemiologie der SSc

Die SSc ist, mit einer Prävalenz von 10–35/100 000 Einwohner und einer Inzidenz von etwa 1/100.000 Einwohner und Jahr (in Europa) eine seltene Erkrankung. Die regionale Prävalenz variiert im weltweiten Vergleich, jedoch sind die Zahlen aufgrund der unterschiedlich großen Dunkelzimmer schwer zu vergleichen.^{4,5} Die SSc kann prinzipiell in jedem Alter auftreten. Der Erkrankungsgipfel liegt jedoch im mittleren

Erwachsenenalter, zwischen 30 und 60 Jahren.⁶ Jüngere Patienten haben ein höheres Risiko für einen diffus-kutanen Verlauf. Die Mortalität korreliert mit dem Alter der Patienten und der Erkrankungsdauer.⁷ Bzgl. Demographie und Verlauf der Erkrankung zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Geschlechtern. Frauen sind viermal häufiger von SSc betroffen als Männer. Betroffene Männer zeigen dabei ein höheres relatives Risiko für die Entwicklung einer diffus-kutanen Verlaufsform mit häufigerem Auftreten schwerer Organkomplikationen.⁷ Trotz Fortschritten in Frühdiagnose und klinischem Management, stellt die SSc nach wie vor die Autoimmunerkrankung in der Rheumatologie dar, welche die höchste Morbidität und Letalität aufweist. Das individuelle Risiko hängt im Wesentlichen von Ausprägung der Organkomplikationen und der Kinetik des Voranschreitens der Erkrankung ab.⁸ Die schlechte Prognose der SSc liegt an fehlenden Therapiemöglichkeiten, insbesondere der schweren Organbeteiligungen wie der primären Herzbeteiligung (*engl. SSc primary Heart Involvement, SSc-pHI*) wodurch sich ein großer *medical need* für ein besseres Verständnis myokardialer Komplikationen der SSc und die Grundidee der vorliegenden Arbeit ergibt.

1.1.3. Ätiologie der SSc

Die Ätiologie der SSc ist nach wie vor unklar. Wie auch bei anderen rheumatischen Erkrankungen muss am ehesten von einer multifaktoriellen Genese ausgegangen werden. Neben einer genetischen Prädisposition besteht ein Einfluss externer Umweltfaktoren, inklusive der dadurch ausgelösten epigenetischen Veränderungen. Zwar konnte eine Assoziation mit bestimmten Genvarianten der Humanes Leukozyten Antigene (HLA) sowie für spezifische Einzel-Nukleotide-Polymorphismen verschiedener Gene nachgewiesen werden.⁹ Zwillingsstudien konnten jedoch, verglichen mit anderen Erkrankungen, nur eine sehr geringe Konkordanz zeigen.¹⁰ Durch Genetik alleine lässt sich die SSc-Entwicklung also nicht erklären. Externe Faktoren scheinen eine wichtige Rolle für die Krankheitsgenese zu spielen. So wurde bereits für eine Reihe verschiedener Umweltfaktoren u.a. Chemikalien (z.B. Silikate, Lösungsmittel, Schwermetalle, Pestizide) oder infektiöse Erreger ein Zusammenhang mit der Entwicklung von SSc vermutet.¹¹ Diese Faktoren könnten, im genetisch-disponierten Individuum, als ein auslösender Trigger des pathogenetischen Netzwerks der SSc fungieren. Im Detail sind die Vorgänge jedoch noch nicht verstanden. Epigenetische Dysregulation scheint jedoch eine zentrale Rolle zu spielen. So konnten bei der SSc in verschiedenen Zellpopulationen z.B. Fibroblasten, Immunzellen oder -Endothelzellen eine Reihe funktionell relevanter epigenetischer Veränderungen nachgewiesen werden – u.a. in Genen von Zelloberflächenproteinen sowie Transkriptionsfaktoren und Proteinen wichtiger intrazellulärer Signalwege für Inflammation und Fibrose^{12,13} Genom-weite DNA Methylierungs-Studien konnten darüber hinaus signifikante Unterschiede zwischen dcSSc und lcSSc nachweisen¹⁴ Ein Zusammenhang zwischen epigenetischem Modifikationsmuster und individuellem Verlauf der Erkrankung, ist damit möglich. Noch ist das epigenetische Gedächtnis

allerdings nicht ausreichend entschlüsselt. Aufgrund der grundsätzlichen Reversibilität epigenetischer Veränderungen stellen diese Aspekte jedoch grundsätzlich ein interessantes Ziel für therapeutische Interventionen dar.^{15,16}

Für eine Vielzahl an Autoimmunerkrankungen wird ein ursächlicher Zusammenhang mit infektiologischen Triggern vermutet. Für Multiple Sklerose konnte jüngst der Zusammenhang zwischen Krankheitsentstehung und Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus belegt werden.¹⁷ Für die SSc wird eine (zumindest teilweise) infektiologische ausgelöste pathologische Disruption von Immunzell- und Stromazell-Homöostase ebenfalls diskutiert – bis dato besteht jedoch keine ausreichende Evidenz für diese Theorien.¹⁸

Eine andere Hypothese, welche jedoch sicherlich nur relevant für ein sehr ausgewähltes Kollektiv an Patienten sein dürfte, ist die feto-maternale Mikrochimerismus Theorie.¹⁹ Tatsächlich wird die SSc (sowie andere rheumatologische Erkrankungen) in manchen Fällen postnatal diagnostiziert. Ob es sich in den Fällen tatsächlich um die Induktion einer Immunreaktion in Folge des HLA-*mismatch* durch Reaktion auf fetale Zellen, welche die Blut-Plazentaschranke überwinden konnten, handelt oder dem Phänomen doch eher eine endokrinologische Erklärung zu Grunde liegt, ist nicht geklärt. Es ist jedoch epidemiologischer Fakt, dass das Risiko für die Entwicklung vieler Autoimmunerkrankungen (inklusive SSc), für das weibliche Geschlecht in jedem Fall (und schwangerschaftsunabhängig) erhöht ist.²⁰

Auch eine paraneoplastische Genese als ursächlicher Trigger konnte im Falle der SSc in speziellen Fällen nachgewiesen werden. Die Identifikation von Risikogruppen (z.B. Nachweis von Anti-RPIII -Autoantikörpern), ist daher wichtig.²¹

1.1.4. Pathogenese der SSc

1.1.4.1. Allgemeine Pathogenese

Die Pathogenese der SSc wird im Wesentlichen durch eine Triade aus Immundysfunktion bzw. Autoimmunität, Vaskulopathie und Fibrose bestimmt. Die kausalen Interaktionen innerhalb der Triade sind bis heute nicht ausreichend verstanden. Aus diesem Grund kommt der Untersuchung von zellulären Interaktionen zwischen Immunzellen, vaskulärer Nische und Stromazell-Nische, wie sie z.B. in dieser Arbeit vorangetrieben wird, einer besonderen Bedeutung bei.²² Es wird an dieser Stelle bereits darauf hingewiesen, dass es organspezifische Besonderheiten z.B. in Haut, Lunge oder Herz gibt, welche für das Verständnis der entsprechenden Organkomplikation essentiell sind. Für eine Übersicht siehe **Abb. 1** (modifiziert nach Truchetet et al. Clin Rev Allergy Immunol. 2023)²³

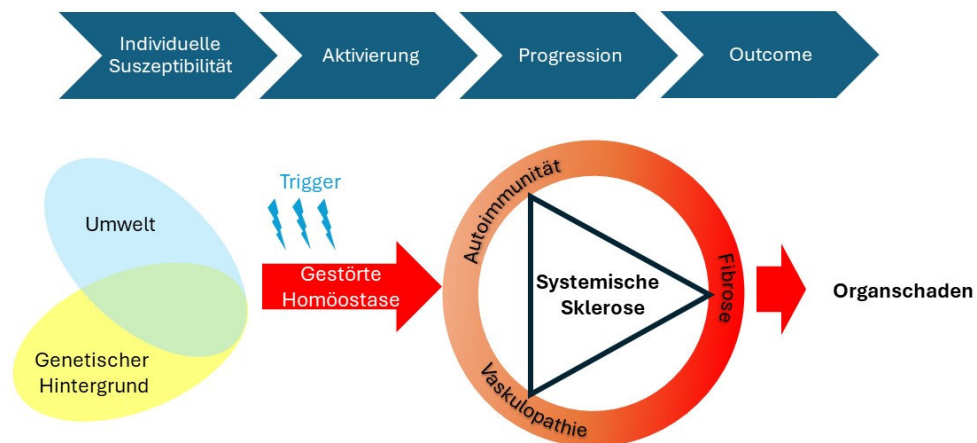


Abb. 1 Übersicht über die Pathogenese der systemischen Sklerose: Auf dem Boden individueller genetischer Suszeptibilität und möglichen Umwelteinflüssen entwickelt sich die pathologische (sich selbst verstärkende) Trias der systemischen Sklerose aus Autoimmunität, Vaskulopathie und progressiver Fibrose, welche schlussendlich zu zunehmender Organschädigung führt.

1.1.4.2. Veränderungen in der vaskulären Nische in der SSc

Eine Vaskulopathie, insbesondere im Bereich der kleinen Arteriolen und der Kapillaren, scheint eine der frühesten Ereignisse während der Entwicklung der SSc darzustellen.²² In verschiedenen Organen konnten dabei sowohl strukturelle Veränderungen im Bereich der Mikrozirkulation (destruktive und obliterative Vaskulopathie), als auch eine funktionelle Dysregulation (Vasospasmen) nachgewiesen werden.²³

Funktionelle Störung der Gefäß-Autoregulation, in Form rezidivierender, insbesondere durch Kälte getriggelter, Vasospasmen (sog. Raynaud-Syndrom), stellen oft das erste klinisch fassbare Symptom der SSc-Erkrankung dar. Ein sehr kurzes Intervall zwischen dem Auftreten des Raynaud-Syndroms und weiteren (*non Raynaud phenomenon*) Symptomen der SSc, ist dabei mit einer schlechten Prognose und rasch-progredientem Krankheitsverlauf assoziiert.²⁴

Strukturelle Veränderungen im Bereich der Mikrozirkulation können mithilfe der Kapillarmikroskopie, orientierend im Bereich der Nagelfalz, ebenfalls mit Erkrankungsbeginn regelhaft dokumentiert werden. Die charakteristischen Veränderungen im Kapillarbett korrelieren dabei mit dem Aktivitätsstadium der systemischen Erkrankung. und werden nach Morphologie in ein „frühes“- „aktives“- und „spätes“-Muster unterteilt. Während sich zu Beginn in der Kapillarmikroskopie typischerweise Hämorrhagien und Megakapillaren darstellen lassen, ist das späte Stadium der Erkrankung durch die zunehmende Desorganisation des Kapillarbett mit Entstehung sogenannter avaskulärer Felder gekennzeichnet.²⁵

Die gemeinsame Konsequenz von funktionellen und histologisch nachweisbaren mikrovaskulären Veränderungen sind die Hypoxie und Minderversorgung im

abhängigen Gewebe. Klinisch treten diese an den Akren durch digitale Ulzerationen und trophische Störungen im Bereich der Fingerendglieder in Erscheinung.²⁶ Auch in anderen betroffenen Organen kommt es zu Zelluntergang und konsekutivem Funktionsverlust. Auf zellulärer Ebene ist die SSc-Vaskulopathie durch eine Aktivierung und konsekutiven Zelltod von Endothelzellen sowie einer generellen endothelialen Dysfunktion charakterisiert. Im Verlauf kommt es zu defektiven vaskulären Reparaturprozessen.²⁷ Dabei konnte nachgewiesen werden, dass auch die Vaskulogenese (also die de novo Neubildung von Blutgefäßen aus zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen) und die Angiogenese (also die Blutgefäß-Neubildung aus bereits existierenden Blutgefäßen) in erkrankten Patienten beeinträchtigt zu sein scheinen.²⁸

Das Wechselspiel zwischen vaskulären Zellen und Immunsystem ist komplex. Eine veränderte Expression von Zelladhäsionsmolekülen auf dem Endothel sowie die Anwesenheit von proinflammatorischen Zytokinen tragen zur vermehrten Adhäsion und Infiltration von Immunzellen ins Gewebe bei und fördern dort die Inflamationsreaktion. Umgekehrt spielt der autoimmune Entzündungsprozess eine zentrale Rolle für den anhaltenden Untergang von Endothelzellen - sowohl durch direkte zelluläre Zytotoxizität als auch durch humorale Vermittlung (u.a. Anti-Endothelzell-Autoantikörper, Komplement). Aktivierte Immunzellen im Gewebe beeinflussen durch Produktion von Entzündungsmediatoren und reaktive Sauerstoffspezies wiederum die Endothel-Permeabilität.^{29,30} Klinisch wird dies in der frühen Phase der SSc durch ödematöse Veränderungen der Extremitäten (*puffy hands*) augenscheinlich.

Auch das Zusammenspiel zwischen den mikrovaskulären Veränderungen in der SSc und der Entstehung und Aufrechterhaltung von Fibrose ist komplex und inkomplett verstanden. Zweifelsfrei stellen Endothelzellen, aber auch andere Zelltypen in der Gefäßwandumgebung u.a. Perizyten und *smooth muscle cells* (VSMCs, dt. vaskuläre glatte Muskelzellen), sowie Fibroblasten - durch einen Transitionsprozess eine wichtige Quelle für pathologische Myofibroblasten dar.^{31,32} Auch scheinen metabolische Alterationen in Folge der Gewebhypoxie und des rezidivierenden Ischämie-Reperfusionsschaden den Fibroseprozess direkt zu fördern.^{32,33} Ein tieferer Einblick in die vaskuläre Nische in der SSc und die zellulären Wechselwirkungen mit anderen Zellpopulationen ist essenziell, um die pathophysiologischen Zusammenhänge weiter entschlüsseln zu können. So konnten Rigau et al. (2024), mithilfe von *Imaging Mass Cytometry* (IMC, dt. bildgebende Massenzytometrie), in der Haut eine neue Population von CD34⁺/CD31⁺/α-SMA⁺ Endothelzellen identifizieren, die in der SSc vermehrt auftrat und in deren Umgebung gehäuft pathophysiologisch relevante Immunzellen und Myofibroblasten gefunden werden. Die Dichte der CD34⁺/CD31⁺/α-SMA⁺ Endothelzellen im dermalen Gewebe, korrelierte dabei mit der klinischen Progression der Fibrose.³⁴

Die okklusiven vaskulopathischen Veränderungen werden zum einen durch den fibrotischen Umbau der Gefäßwand, der zu einer Einengung des Lumens führt, zum

anderen durch vermehrte Gerinnungsaktivierung mit konsekutiver intravaskulärer Thrombenbildung mediert. Obgleich in Thrombozyten von SSc-Patienten durchaus Alterationen im Vergleich zu Thrombozyten von gesunden Personen gefunden werden konnten (z.B. im Integrin-TypI-Kollagen-Rezeptor), scheint die sekundäre Störung des Gerinnungssystems, in Folge der Endothelzellpathologie, jedoch im Vordergrund zu stehen.³⁵ Klinisch spielt die Gerinnungsaktivierung v.a. in der Pathophysiologie der pulmonal arteriellen Hypertonie (PAH) oder der renalen Krise eine wichtige Rolle ^{36,37}

1.1.4.3. Veränderungen in der Immunzell-Nische in der SSc

Auch wenn weniger offensichtlich als bei anderen Erkrankungen aus dem Kollagenose-Spektrum, spielt die autoimmune Entzündung v.a. in der Frühphase der Erkrankung auch bei der SSc eine zentrale Rolle und scheint, neben der Vaskulopathie, den konsequenten Prozess der chronischen Wundheilungsreaktion bzw. Fibrosierung zu triggern. Klinisch ist der Grad entzündlicher Symptomatik variabel und reicht von charakteristischen *puffy fingers* (als Folge der entzündungsbedingten erhöhten vaskulären Permeabilität) über systemische Erhöhung der Inflamationsparameter bis zu manifester Arthritis oder Myositis. Auch im Rahmen häufiger Organbeteiligungen wie z.B. der SSc-interstitielle Lungenerkrankung (*engl.: interstitial lung disease, ILD*) oder der SSc-pHI lässt sich radiologisch und histologisch Entzündlichkeit detektieren.

Über die autoimmune Natur der Entzündung herrscht dabei (trotz ungeklärter Ätiopathogenese) allgemeiner Konsens. Die Annahme einer fehlenden Selbsttoleranz wird u.a. auch durch die (oben erwähnte) Assoziation mit bestimmten HLA-Allelen sowie Beobachtungen einer teils frappierenden klinischen und pathophysiologischen Ähnlichkeit zwischen der SSc und chronischer (sklerodermiformer) Graft-versus-Host Erkrankung, welche als Komplikation nach allogener Stammzelltransplantation auftreten kann, unterstützt.^{38,39} Der zentrale Auslöser der Immundysregulation ist jedoch bis dato unverstanden.

Die Immundysregulation in der SSc ist komplex. So spielen humorale und zelluläre Faktoren sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems in der Pathogenese der Erkrankung eine wichtige Rolle.⁴⁰

Charakteristisches Merkmal der Autoimmunität bei rheumatischen Erkrankungen aus dem Kollagenose-Spektrum ist die hohe Prävalenz von Anti-Nukleären-Autoantikörpern (ANA) obgleich eine ANA -Negativität eine SSc keineswegs ausschließt (ca. 10% der Fälle). Daneben gibt es eine Reihe SSc-typischer Autoantikörper welche eine hohe Spezifität für die SSc aufweisen z.B. Anti-Topoisomerase I (Anti-Scl70)-, Anti-Centromer A/ B (Anti-CA/B)- oder Anti-RNA-Polymerase III (Anti-RNAPIII)-Autoantikörper. ⁴¹ Es fällt auf, dass die Antigene ubiquitär und insbesondere nukleär exprimiert sind. Für die Diagnostik der SSc-Erkrankung spielen die oben genannten Autoantikörper eine wichtige Rolle. Durch ihre Assoziation mit dem klinischen Phänotyp sind sie darüber hinaus auch prognostisch relevant. Die pathophysiologische Relevanz wird hingegen nach wie vor kontrovers diskutiert. Nicht wenige Experten halten die oben genannten Autoantikörper weniger für kausal relevant, als viel mehr für

ein „Epiphänomen“ der Autoimmunreaktion im Hintergrund.⁴² Auch die Detektion so genannter natürlicher Antikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (z.B: Anti-Endothelin-1 Typ A Rezeptor -, Angiotensin II Typ 1 Rezeptor - oder Anti-*Platelet-derived growth factor* Rezeptor -Autoantikörper) in der SSc, welche prinzipiell jedoch auch im Serum gesunder Testpersonen regelhaft detektiert werden können und denen ein agonistischer/antagonistischer Effekt auf die entsprechenden Signalkaskaden zugeschrieben wird, wird unterschiedlich gewertet.^{43,44}

Immunzellinfiltrate in der SSc sind häufig interstitiell und perivaskulär lokalisiert. Wie oben bereits erläutert trägt die Immunreaktion zur Vaskulopathie bei. Daneben wird durch den inflammatorischen Gewebeschaden jedoch auch die Fibrosereaktion getriggert. Der Effekt wird durch direkte Immunzell-Stromazell-Interaktion genauso wie indirekt durch die Sekretion von proinflammatorischen/profibrotischen Zytokinen wie z.B. Interleukine (IL) (u.a. IL6, IL4, IL13), Interferon Typ I oder *Transforming growth factor beta* (TGF- β) vermittelt.^{45,46} Es sei ausdrücklich betont, dass dieser *cross-talk* bidirektionaler Natur ist.⁴⁷ Auch das angeborene Immunsystem trägt durch Erkennung von pathogenassoziierten molekularen Mustern und schadenassoziierten molekularen Mustern zur Aktivierung der pathogenen Triade bei, u.a. durch Aktivierung des Inflammasoms. Pattern-Recognition-Rezeptoren werde dabei nicht nur von Zellen des angeborenen Immunsystems, sondern auch von mesenchymalen Zellen (z.B. Endothelzellen und Fibroblasten) exprimiert.^{48,49}

Inzwischen ist eine pathophysiologische Beteiligung in der SSc für zahlreiche Immunzell(sub)populationen beschrieben. Das Netzwerk als Ganzes ist jedoch noch nicht ausreichend decodiert. Neben Lymphozyten (B-Zellen, zytotoxischen T Zellen, T-Helfer Zellen - im Besonderen vom Th2 Typ), Makrophagen -insbesondere vom M2 Typ und antigenpräsentierenden Zellen (z.B. dendritischen Zellen oder Monozyten), scheinen auch NK Zellen oder Mastzellen von Relevanz zu sein.⁵⁰ Ohne Frage muss jedoch grundsätzlich von großen organspezifischen Unterschieden im zellulären Netzwerk ausgegangen werden. Die meisten Ergebnisse zur Immundysfunktion und der Immunzell-Nische in der SSc stammen bislang aus Haut und Lunge.

1.1.4.4. Veränderungen in der Stromazell-Nische in der SSc

Unter Fibrose versteht man die pathologische Akkumulation von ECM (im besonderen Kollagen Typ I und III) in einem Gewebe, als Ausdruck defektiver Reparaturprozesse bzw. einer pathologischen Reaktion auf einen (in den meisten Fällen chronischen) Stimulus z.B. (toxischen) Gewebeschaden oder Entzündung. In Folge des fibrotischen Umbaus kommt es (unabhängig vom auslösenden Schaden) selbst zu einer weiteren Schädigung der Gewebearchitektur und konsekutiv zur Beeinträchtigung der charakteristischen Gewebefunktion. Die ECM legt durch Bestimmung der Gewebestruktur maßgeblich den Grundstein für die gewebespezifische Funktionalität. Im Gegensatz zur physiologischen Wundheilung scheint die natürliche Terminierung des Reparatur-Prozesses in der Fibrose gestört zu sein, so dass es zu anhaltender, überschießender Bildung von dysfunktionalem „Narbgewebe“ kommt, welches die

zelluläre Funktion und Interaktion beeinträchtigten. Es wird vermutet, dass bis zu 45% aller Todesfälle (zumindest in der industrialisierten Welt) pathophysiologisch auf fibrotische Komplikationen zurückzuführen sind. Eine effektive Behandlung existiert bislang noch nicht. Der enormen Bedarf für neue Therapien erklärt, warum ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge im Zusammenhang mit der fibrotischen Gewebereaktion von enormer Wichtigkeit ist.⁵¹ Die Besonderheit bei der SSc liegt dabei sicherlich im systemischen Verlauf mit teils paralleler, teils konsekutiver Beteiligung unterschiedlicher Organsysteme.⁵²

Nach wie vor bestehen zu wenig Wissen und nur vage theoretische Konzepte über die genauen Vorgänge auf zellulärer Ebene und die Bedeutung unterschiedlicher Subpopulationen in der Stromazell-Nische im Fibroseprozess. Als anerkannt gilt, dass es im Verlauf der Fibrose zu einer Expansion und Aktivierung von Fibroblasten, einschließlich der Differenzierung zu Myofibroblasten, kommt. Diese Myofibroblasten gelten traditionell als die zentralen zellulären Akteure in der Fibrosereaktion. Myofibroblasten zeichnen sich durch die Expression von α -SMA (engl.: *alpha smooth muscle actin*, dt. α -Glattmuskel-Aktin), welche den Zellen eine gewisse Kontraktilität verleiht, sowie die exzessive Produktion von ECM aus. Die kontraktile Funktion scheint im physiologischen Wundheilungsprozess wichtig zu sein, für das Erzielen des Wundverschlusses durch Adaption der Wundränder. Auch die ECM Produktion ist für den Ausgleich eines Gewebedefektes in der Wundheilung eine unerlässliche Eigenschaft.⁵³

Die wissenschaftlichen Fortschritte auf *single-cell* Ebene, haben die ausgeprägte (funktionelle) Heterogenität der Fibroblasten innerhalb eines Gewebes und zwischen verschiedenen Geweben, erstmal begonnen zu offenbaren. Die neue Sichtweise auf Fibroblasten lässt jedoch darauf schließen, dass die Reduktion eines komplexen Prozesses, wie der Fibrose, auf eine einzelne Subpopulation von sogenannten Myofibroblasten, zu stark vereinfacht ist. Vielmehr ist davon auszugehen, dass verschiedene Stromazell-Subpopulationen mit unterschiedlicher (teils gewebeabhängiger) Spezialisierung und in Interaktion mit anderen Zellpopulationen, im Prozess der Fibrosierung mitmischen.⁵⁴ Durch Methoden des *Lineage-Tracings* konnte zudem eine ungeahnte *inter-lineage plasticity* aufgedeckt werden. Der Pool an *Myofibroblast-like-stromal cells* wird demnach durch Rekrutierung sowohl von Fibrozyten (aus dem Knochenmark) als auch durch Transdifferenzierung aus anderen gewebeständigen Populationen (u.a. Fibroblasten, Epithelzellen, Zellen der Gefäßwand (wie z.B. Endothelzellen, Perizyten oder VSMCs) aber auch anderen Zellpopulationen wie z.B. Makrophagen oder Adipozyten) erreicht.⁵⁸

Über Jahrzehnte galt zudem das Paradigma, dass Fibrose per se einen irreversiblen Zustand von *tissue damage* darstellt. Diese starre Ansicht wurde, insbesondere auch in Folge des besseren Verständnisses der Plastizität von Fibroblasten, zunehmend verlassen. Es ist davon auszugehen, dass Plastizität grundsätzlich in beide Richtungen existiert und eine Reprogrammierung von „profibrotischen“-Fibroblasten theoretisch möglich ist. Dieses Phänomen wurde bereits in verschiedenen Organen erfolgreich

demonstriert.^{55,56} So konnte nachdem gezeigt wurde, dass der Transkriptionsfaktor PU.1 eine wichtige Rolle bei der Umwandlung von ruhenden oder ECM-abbauenden Fibroblasten in profibrotische, ECM-produzierende Fibroblasten spielt. Durch Inhibition von PU.1 konnte unter experimentellen Bedingungen, der Prozess der Fibrose erfolgreich umgekehrt werden.⁵⁷ Eine (komplette) funktionelle Regeneration des Gewebes kann, in Folge der ursprünglichen Schädigung, wohl in den seltensten Fällen erreicht werden.

Physiologisch unterliegt die ECM einem permanenten Umbau, welcher u.a. durch Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs) und deren Inhibitoren sogenannten Tissue-Inhibitors of MMPs (TIMPs) gesteuert wird. Die Flexibilität des Gewebeumbaus ermöglicht die konstante Anpassung auf Umgebungsänderungen. In der SSc scheint ein Ungleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs mit zur ECM Akkumulation beizutragen.^{58,59}

Die pathologisch veränderte ECM stellt jedoch keineswegs nur das passive Endprodukt des Fibroseprozesses dar, sondern hält den Prozess der Fibrosierung selbst aktiv, durch eine Art positive Rückkopplung, aufrecht.⁶⁰ So stehen sämtliche Zellen über spezielle Rezeptoren (insbesondere aus der Integrin-Familie) in konstanter Wechselwirkungen mit den Bestandteilen der ECM, und werden in Aktivität/Polarisation durch diese Interaktion beeinflusst.⁶¹ Auf diese Weise werden, durch die erhöhte Steifigkeit von fibrotischem Gewebe, über Mechanismen der Mechanosensorik (u.a. *Hippo- Yes1 Associated Transcriptional Regulator/ Tafazzin* (YAP/TAZ)) pro-fibrotischer Signalwege aktiviert, welche die Steifigkeit des Gewebes durch weiteren fibrotischen Umbau weiter vorantreiben.^{62,63}

Der Beitrag verschiedener Signalwege für Initiierung und Aufrechterhaltung der Fibrose wurden für fibrotische Erkrankungen im Allgemeinen und in der SSc im Speziellen untersucht. So spielen neben dem TGF- β Signalweg auch u.a. *Wingless/Integrated* (Wnt) /*beta-Catenin*-, *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) -, YAP/TAZ-, Janus-Kinase /*Signal Transducer and Activator of Transcription* (JAK/STAT)-, (Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)-, oder Phosphatidylinositol-3-Kinase/ Protein Kinase B/ *mechanistic target of Rapamycin* (PI3K/AKT/mTOR) -Signalwege eine entscheidende Rolle.⁶⁴ Durch ein vertieftes Verständnis der SSc-Fibrose auf molekularer Ebene, insbesondere auch hinsichtlich des Zusammenspiels zwischen Fibrose und Vaskulopathie bzw. autoimmuner Dysfunktion, eröffnen sich perspektivisch sicherlich neue Möglichkeiten für effektive antifibrotische Behandlungsstrategien. So ist 2015 mit dem Multi-Tyrosinkinaseinhibitor Nintedanib ein erstes, antifibrotisch wirkendes Medikament auf den Markt gekommen (Zulassung für progressive ILD inklusive SSc ILD).⁶⁵

Nintedanib hemmt als *small molecule* - sowohl durch direkte Bindung von nicht-rezeptorgebundenen Tyrosinkinasen wie Src und Lck als auch durch Blockade intrazellulärer Adenosintriphosphat-Bindungsstelle der Rezeptoren (u.a. *Fibroblast Growth Factor Receptor* (FGFR), *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor* (VEGFR), *Platelet-Derived Growth Factor Receptor* (PDGFR) - wichtige Signalwege, welche sowohl

bei Fibroblasten Aktivierung als auch Angiogenese in der Lunge (bei SSc) eine wichtige Rolle spielen. Auch eine antientzündliche Aktivität konnte aufgezeigt werden.^{66,67}

1.1.5. Klinische Aspekte der SSc

1.1.5.1. Symptomatik der SSc

Das klinische Bild der SSc ist sehr heterogen und der individuelle Verlauf der Erkrankung und das Therapieansprechen sind schwer vorherzusagen. Insbesondere in der Frühphase ist die präsentierte Symptomatik oft sehr unspezifisch. Das Auftreten akraler Durchblutungsstörungen bei Kälte (Raynaud-Syndrom) und eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes mit anhaltender Fatigue sind in der Rückschau häufig die ersten Manifestationen der Erkrankung. Die SSc-Diagnose wird jedoch oft erst mit Auftreten der charakteristischen Hautverdickung gestellt, welche sich in der Regel zentripetal (also von distal zum Stamm hin ausbreitet). Ebenfalls frühzeitig betroffen ist neben den Akren häufig die Haut im Gesichtsbereich. Während der erste Eindruck und die Lebensqualität bei mildem Verlauf vor allem durch Ausmaß der Hautfibrose bestimmt wird, werden Morbidität und Mortalität der Erkrankung wesentlich durch Art und Schwere der Beteiligung innerer Organe – insbesondere Lunge, Herz und Gastrointestinaltrakt, beeinflusst.⁶⁸ (Für eine Übersicht möglicher Komplikationen der SSc siehe Abb. 2). Tatsächlich verbessert sich der mRSS (modifizierter Rodnan Skin Score), der zur Quantifizierung der charakteristischen Hautfibrose bei SSc verwendet wird, nach Erreichen eines individuellen Maximalwertes im Laufe der Zeit häufig spontan wieder, während z.B. die Lungenfibrose oder die Herzbeteiligung progredient voranschreiten. Umgekehrt korreliert der maximale mRSS jedoch statistisch mit dem Ausmaß der Beteiligung innerer Organe.⁵⁶

1.1.5.2. Diagnostik der SSc

Die SSc-Diagnose basiert auf den derzeit anerkannten ACR/EULAR Klassifikationskriterien von 2013 (siehe: Tabelle 1).⁶⁹ Die Diagnose SSc kann ab einem Gesamtpunktwert von ≥ 9 nach Ausschluss von Differenzialdiagnosen - „*scleroderma-like disorders*“ gestellt werden. Die Morphea (auch zirkumskripte Sklerodermie bezeichnet), bei der es ausschließlich zur fokalen Hautfibrose kommt stellt klinisch zwar eine wichtige Differenzialdiagnose der SSc dar, muss aufgrund des fehlenden systemischen Verlaufs jedoch sehr klar von der SSc abgegrenzt werden.⁷⁰

Abb. 2 (nächste Seite) Mögliche klinische Manifestationen der systemischen Sklerose: Die systemische Sklerose zeichnet sich durch einen systemischen Verlauf aus, i.d.R. mit Beteiligung verschiedener Organsysteme. Die individuelle Ausprägung ist jedoch sehr variabel.
[Created in BioRender. Stütz, A. (2025) <https://BioRender.com/y441jz2>]

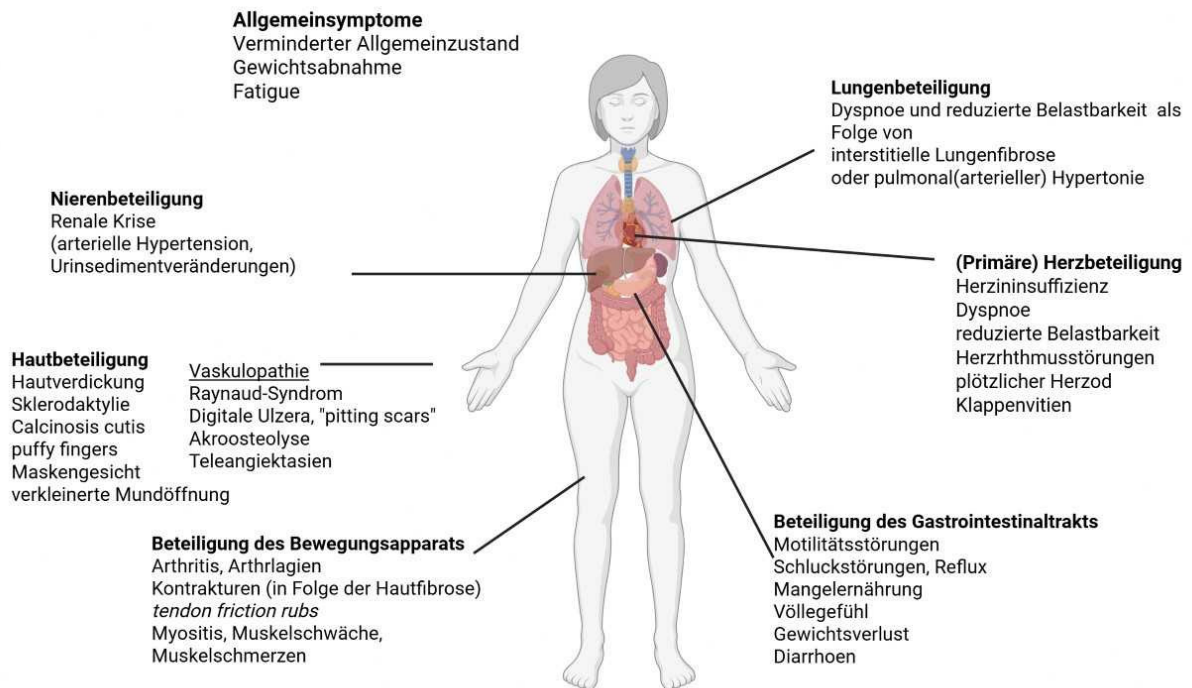


Tabelle 1 ACR/EULAR Klassifikationskriterien (2013) der systemischen Sklerose (SSc)

Kriterien	Unterkriterien (nur höchster Punktwert /Kriterium zählt)	Punktzahl
Hautverdickung der Finger beider Hände bis proximal der MCP-Gelenke		9
Hautbeteiligung der Finger	diffus geschwollene Finger	2
	Sklerodaktylie proximal der PIP-Gelenke (distal der MCP-Gelenke)	4
Läsionen der Fingerspitze	Digitale Ulzera	2
	eingezogene Narben an den Fingerkuppen	3
Teleangiektasien		2
Charakteristische Auffälligkeiten in der Kapillarmikroskopie	Megakapillare Avaskuläre Bereiche im Kapillarbett Perikapilläre Hämorrhagie	2
Lungenbeteiligung	Pulmonale Hypertonie	2
	Interstitielle Lungenfibrose	2
Raynaud Syndrom		3
SSc-assoziierte Autoantikörper	Anti-Centromer-Ak	3
	Anti-Topoisomerase I (Scl-70) -Ak	
	Anti-RNA-Polymerase III - Ak	

Abkürzungen: ACR/EULAR: American College of Rheumatology/ European Alliance of Associations for Rheumatology; SSc: engl. *systemic sclerosis*, dt. systemische Sklerose; MCP-Gelenke: Metacarpophalangealgelenke; Ak: Autoantikörper

Neben einer sorgfältigen Anamnese und klinischen Untersuchung kommt der serologischen Untersuchung und ggf. Kapillarmikroskopie bei Erstdiagnose eine wichtige Rolle zu. In der körperlichen Untersuchung kann mithilfe des mRSS der Progress der Hautbeteiligung objektiviert werden. Hierbei wird in 17 definierten Körperarealen die Hautverdickung mit einem Punktwert von 0-3 bewertet (mRSS 0-51). In der Regel folgt einer ödematösen frühen Phase (ca. 6-12 Monate) eine charakteristische fibrotische/indurative Phase mit progressivem mRSS welche mehrere Jahre anhält, bevor es zu einer Atrophie (oft mit sinkendem mRSS) in der Spätphase der Erkrankung kommt.⁷¹

Das individuelle Autoantikörper-Profil ist prognostisch relevant. So sind Anti-Scl70 Antikörper mit einer dcSSc und dem Auftreten von ILD (aber auch SSc-pHI) assoziiert. Anti-Centromer Antikörper hingegen können gehäuft bei Patienten mit lcSSc Verlaufsform nachgewiesen werden und sind mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer PAH verbunden. Anti-RNAPIII Autoantikörper scheinen ebenfalls mit einer dcSSc sowie der Entwicklung einer renalen Krise korreliert. Auch konnte ein gehäuftes Auftreten von Anti RNA-Pol III Autoantikörper bei Patienten mit synchroner Malignomdiagnose - wenige Jahre vor/nach- SSc Erstdiagnose beobachtet werden.⁷²

Durch die zunehmend bessere Phänotypisierung der Patienten zeichnet sich ab, dass die historische Stratifizierung nach dem Grad der Hautbeteiligung (dcSSc, lcSSc, SSc sine scleroderma), unzureichend für die individuelle Klassifizierung des Risikos für einen schweren Verlauf ist. Sobanski et al. konnten beispielsweise durch Auswertung von insgesamt 24 klinischen und serologischen Variablen in einer Kohorte von über 6927 SSc-Patienten aus der EUSTAR (*European Scleroderma Trials and Research Group*) - Datenbank, sechs distinkte Patienten Cluster nachweisen.⁷³ In Zukunft ist, u.a. dank der Fortschritte im Feld der (Multi-)Omics-Technologien, die Definition einer Reihe von molekularen SSc-Subtypen zu erwarten, welche die große klinische Heterogenität der Erkrankung besser erklären können und den individuellen Verlauf und das Therapieansprechen im Einzelfall besser vorhersagen werden. Bemühungen in diese Richtung verfolgen somit keineswegs ein rein wissenschaftliches Interesse, sondern sind - ganz im Sinne der Präzisionsmedizin -diagnostisch und therapeutisch von hoher Relevanz.^{74,75}

Da die verfügbare *standard of care* im besten Fall einen Progress der Erkrankung verhindert - jedoch bereits eingetretenen fibrotische Komplikationen nicht auflösen kann, kommt in der klinischen Praxis der frühen Erstdiagnose (vor dem Eintreten von aus heutiger Sicht irreversiblen Schäden) sowie dem rechtzeitigen Erkennen und der optimalen Therapie von Organ-Komplikationen eine wichtige Bedeutung zu. Regelmäßige Basisuntersuchungen, wie die Kontrolle der Lungenfunktion mit CO-Diffusionsmessung, der Elektrokardiographie (EKG) und der transthorakaler Echokardiographie (TTE) mit Bestimmung des systolischen Pulmonalarteriendrucks, sind dabei essenziell. Zur präzisen Abklärung einer P(A)H ist eine Rechtsherzkatheteruntersuchung indiziert. Eine frühzeitige *high-resolution*

Computertomographie der Lunge bei Erstdiagnose (sowie je nach Befund regelmäßige Verlaufskontrollen) sind ebenfalls wichtig, da die SSc-ILD immer noch die Haupttodesursache bei SSc darstellt. Auch der Blutdruck sollte gemessen werden, da ein Blutdruckanstieg (ggf. begleitet von Auffälligkeiten des Urinsediments) oft das erste Zeichen einer beginnenden renalen Krise darstellt. Bei hochgradigem V.a. eine renale Krise ist eine Nierenbiopsie erforderlich. Das weitere Organ-Staging ist i.d.R. abhängig von der Klinik. Bildgebende Verfahren wie z.B. Kardio-MRT und (FAPI) PET-CT spielen in den letzten Jahren jedoch eine zunehmend wichtigere Rolle.

Eine Herausforderung durch den diagnostischen Fortschritt stellt der adäquate Umgang mit noch sehr frühen Erkrankungsstadien, welche die ACR/EULAR Klassifikationskriterien für die SSc (noch) nicht erfüllen, dar. Für diese *very early diagnosis of SSc* (VEDOSS) Fälle besteht die Notwendigkeit gesonderter Kriterien. So zeigten Patienten mit Raynaud Syndrom, bei Nachweis von SSc-spezifischen Antikörpern (und ANA) sowie Vorhandensein von *puffy fingers* zu 94% einen Progress zu einer manifesten SSc. Das Fehlen von ANA bei Erstdiagnose des Raynaud-Syndroms hingegen war statistisch mit dem geringsten Risiko für die Entstehung einer SSc assoziiert.⁷⁶

1.1.5.3. Therapie der SSc

Durch Fortschritte in der Diagnostik und dem symptomorientierten klinischen Management von kritischen Organbeteiligungen konnte die Lebenserwartung und Qualität von Patienten mit SSc in den letzten Jahren kontinuierlich verbessert werden. Dennoch bleiben die therapeutischen Möglichkeiten begrenzt und die SSc gilt bislang als nicht heilbar. Eine der größten Herausforderungen im klinischen Alltag ist das Fehlen evidenzbasierter Leitlinien in vielen Bereichen des Managements dieser komplexen Erkrankung.⁷⁷

Die meisten medikamentösen Basistherapien zielen auf die Immundysfunktion der Erkrankung ab. Dabei kommen (oftmals *off-label*) immunsuppressive Therapeutika wie Methotrexat (MTX), Mycophenolat-Mofetil (MMF) oder Cyclophosphamid (CYC) zum Einsatz. Auch eine Anti-IL6-Therapie mit Tocilizumab (TOC) wird bei hochinflammatorischen Verläufen angewendet. Zudem scheint eine B-Zell-Depletion mit Rituximab (RTX) (Anti-CD20) ebenfalls einen positiven Effekt zu haben.⁷⁸ Im Rahmen von individuellen Heilversuchen wurden jüngst auch CD19.CAR-T-Zellen sowie verschiedene bispezifische Antikörper (Teclistamab, Blinatumomab) zur tieferen B-Zell Depletion eingesetzt.^{79–82}

Da insbesondere in der Frühphase der Erkrankung die autoimmune Entzündung über den fibrotischen Schaden dominiert, ist die frühe Initiierung einer wirkungsvollen immunsuppressiven Therapie wichtig – jedoch muss der Nutzen stets gegen das individuelle Risiko von infektiösen Komplikationen abgewogen werden. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die immunsuppressive Behandlung keineswegs allein die führend entzündlichen Komplikationen der Erkrankung, wie begleitende Arthritis oder Myositis, verbessert, sondern indirekt auch zu einer Verlangsamung - beziehungsweise

Stabilisierung – von z.B. Haut- oder Lungenfibrose beitragen kann.^{83–86} Trotz der eindeutigen pathophysiologischen Relevanz der Autoimmunreaktion in der SSc, zeigen die bisherigen Standardimmuntherapien, verglichen mit dem erfolgreichen Einsatz in anderen Autoimmunerkrankungen, jedoch in der Zusammenschau weit weniger gute Resultate. Selbst ein vollständiger *Reset* des Immunsystems durch eine (autologe) Stammzelltransplantation führt, insbesondere in späten Erkrankungsphasen, keineswegs regelhaft zur „Heilung“ der Erkrankung - welche eine vollständige Resolution der Fibrose implizieren würde. Im besten Fall wird eine Stagnation des Erkrankungsverlaufes ohne weitere medikamentöse Behandlung erreicht. Über den Wert der Stammzelltransplantation wird, insbesondere aufgrund der hohen Toxizität der myeloablativen Chemotherapie und des hohen therapieassoziierten Mortalitätsrisikos, in der Fachgemeinschaft daher kontrovers diskutiert.^{87,88}

Im Gegensatz zu anderen Autoimmunerkrankungen kommen Glucocorticoide (GC) in der Behandlung der SSc nicht regelhaft zum Einsatz. Grundsätzlich spricht die inflammatorische Symptomatik, insbesondere eine muskuloskelettale Beteiligung z.B. die inflammatorische Komponente der ILD oder eine Myokarditis durchaus gut auf eine GC Behandlung an, jedoch zeigte sich in Studien ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer renalen Krise bei SSc-Patienten, welche mit GC behandelt wurden. Das Risiko scheint neben patientenspezifischen Faktoren (z.B. dcSSc, anti-RNAPIII Autoantikörper) insbesondere auch mit der Höhe des verabreichten Steroidstoßes assoziiert zu sein. Der genaue pathophysiologische Zusammenhang zwischen GC und der Entwicklung einer SSc renalen Krise ist bislang nicht schlüssig erklärt. Aufgrund der relevanten Mortalität bei Auftreten einer renalen Krise wird der Einsatz von GC jedoch sehr restriktiv gehandhabt – kann im Einzelfall, insbesondere hochinflammatorischem Erkrankungsverlauf oder Therapie von Komplikationen jedoch erwogen werden.⁸⁹

Die vaskulären Komplikationen der SSc, wie das Raynaud-Syndrom, die digitalen Ulzerationen und die PAH, können durch vasoaktive Medikamente symptomatisch gelindert werden. Zu diesen Medikamenten gehören u.a. Calciumantagonisten, Prostanoiden und Phosphodiesterase-5-Inhibitoren. Eine kausale Behandlung der Vaskulopathie existiert jedoch bislang nicht.⁹⁰

Dank des wachsenden Wissens über die pathophysiologischen Zusammenhänge wurden, wie oben bereits dargestellt, in den letzten Jahren auch die Entwicklung erster antifibrotisch-wirkender Therapien vorangetrieben. Eine Reihe neuer (bzw. in anderen Erkrankungen etablierter) zielgerichteter Therapien für die SSc werden derzeit in Phase 1 und Phase 2 Studien untersucht.⁹¹ Die Zulassung des Tyrosinkinaseinhibitors Nintedanib im Jahr 2020 zur Behandlung der chronisch progredienten fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankung (ILD) bei SSc war ein wichtiger Meilenstein. Obgleich der Prozess der Fibrose bis dato nicht rückgängig gemacht werden kann, konnte in randomisierten, placebokontrollierten Doppelblindstudien eine Verlangsamung der Progredienz der Lungenfibrose und folglich eine Stabilisierung (im Einzelfall sogar eine Verbesserung) der Lungenfunktion bei mit Nintedanib behandelten Patienten nachgewiesen werden.^{92,93}

Grundsätzlich muss die Therapie der SSc individuell an den Krankheitsverlauf angepasst werden - wobei das Ziel der derzeit vorhandenen Therapien eine Stabilisierung der Erkrankung (ggf. mit tendenzieller Besserung) ist. Da eine Heilung der SSc bislang nicht möglich ist, sollte die Lebensqualität der Patienten im Vordergrund stehen. Die Linderung von Schmerzen durch adäquate Analgesie sowie die symptomatische Behandlung belastender Symptome wie Reflux (mit Protonenpumpen-Inhibitoren) oder Diarrhoe (mit Loperamid) sollten daher nicht vernachlässigt werden. Auch die Einstellung kardiovaskulärer Risikofaktoren wie z.B. einer vorliegenden arteriellen Hypertonie oder im Falle von Nikotinabusus die Unterstützung bei der Raucherentwöhnung sind ebenfalls essentiell für das langfristige Outcome und die Prophylaxe von Folgekomplikationen.⁹⁴

1.2. Primäre Herzbeteiligung bei SSc (SSc-pHI)

1.2.1. Definition der SSc-pHI und historische Einordnung

Eine mögliche Beteiligung des Herzens im Rahmen einer SSc wurde bereits 1926 von J. Heine thematisiert, der in einem Aufsatz den Autopsiebefund einer Patientin mit „eigenartige[m] Krankheitsbild von diffuser Sklerosis der Haut und innerer Organe“ beschrieb.⁹⁵ Die erste systematische Untersuchung der SSc Herzbeteiligung stammt aus dem Jahre 1943 von Weiss et al., welche u.a. im Herzen von 9 SSc Patienten post-mortem detailliert histopathologische Veränderungen und insbesondere die charakteristische myokardiale Fibrose erörterten.⁹⁶

Tatsächlich entspringt viel des heute vorhandenen Wissens über die Herzbeteiligung bei SSc Autopsiebefunden. Aufgrund fehlender Krankheitskriterien und differenzialdiagnostischen Wissens ist die Aussagekraft der Daten aus heutiger Sicht jedoch begrenzt. Das langjährige Fehlen einer einheitlichen Definition der SSc-pHI erschwerte die wissenschaftliche Auseinandersetzung mit der SSc-pHI und musste bei der Literaturrecherche für diese Arbeit stets kritisch berücksichtigt werden, da sich die Ergebnisse unterschiedlicher Studien ohne eine allgemein anerkannte Definition und klare Klassifikationskriterien, eigentlich nicht miteinander vergleichen lassen.

Im Fokus der vorliegenden Arbeit sollte die primäre Herzbeteiligung bei SSc stehen. Heutzutage wird die SSc-pHI als direkte Folge des systemischen Krankheitsprozesses verstanden, welcher das Herzgewebe betrifft. Davon abgegrenzt werden sekundäre Effekte der SSc-Erkrankung auf das Herz (z.B. in Folge einer PAH oder einer renalen Krise).

Erst 2022 veröffentlichte ein internationales Gremium im Auftrag der World Scleroderma Foundation (WSF) und der Heart Failure Association (HFA) in einem Abstract, auf dem Boden einer umfassenden Literaturrecherche und interdisziplinären Diskussion, eine erste Konsensus-Definition der SSc-pHI.

„[SSc-pHI] comprises cardiac abnormalities that are predominantly attributable to SSc rather than other causes and/or complications. [SSc-pHI] may be sub-clinical and must be confirmed*

*through diagnostic investigation. The pathogenesis of [SSc-pHI] comprises one or more of inflammation, fibrosis and vasculopathy. *Non SSc-specific cardiac conditions (e.g. Ischaemic heart disease, arterial hypertension, drug toxicity, other cardiomyopathy, primary valvular disease) and/or SSc non cardiac conditions (e.g. PAH, Renal involvement, ILD). “⁹⁷*

Die Definition der SSc-pHI erfolgt demnach indirekt durch den konsequenten Ausschluss anderer (sekundärer oder unabhängiger) möglicher Ursachen für die kardiale Pathologie. Obgleich die Definition, insbesondere für die wissenschaftliche Auseinandersetzung mit der SSc-pHI einen klaren Meilenstein darstellt, ist der praktische Nutzen der Definition sicherlich limitiert, da sich die Differenzialdiagnostik in der Praxis weiterhin äußerst schwierig gestaltet. Zum einen ist davon auszugehen, dass die Probleme in der Realität bei vielen Patienten gleichzeitig vorliegen. Fälle mit SSc-pHI und gleichzeitig vorliegender sekundärer Herzbeteiligung und/oder anderer kardialen Komorbidität wie (z.B. hypertensiver Kardiomyopathie) werden jedoch per se aus der Definition ausgeschlossen. Die Definition erreicht also nur einen kleinen Anteil aller SSc-pHI Patienten. Dass die SSc als solche bereits mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko einhergeht macht das Grundproblem zusätzlich deutlich.⁹⁸ Zum anderen ist durch das Fehlen klar definierter Kriterien (klinische Parameter, Bildgebung, funktionelle Befunde, Laborparameter etc.) die klinische Anwendbarkeit zur Diagnosestellung begrenzt. Auch der Nutzen für die praktische wissenschaftliche Aufarbeitung von Patientenkohorten ist durch die vage Formulierung nicht ohne weiteres möglich.

1.2.2. Epidemiologie der SSc-pHI

Aufgrund der ausgeführten Schwierigkeiten mit der Definition stellt die SSc-pHI bis heute einen weitgehend blinden Fleck dar. In der klinischen Praxis ist von einer relevanten Unterversorgung und einer großen Dunkelziffer nicht diagnostizierter symptomatischer oder relevanter subklinischer Fälle auszugehen. Auch in der translationalen Grundlagenforschung sowie bei der Durchführung klinischer Studien, wurde die Herzbeteiligung als klinischer Endpunkt in der Vergangenheit regelhaft vernachlässigt.

Epidemiologische Daten zur SSc-pHI können daher sicherlich nur unter Vorbehalt betrachtet werden. Die Relevanz kann jedoch nicht bestritten werden. So scheint die Herzbeteiligung (trotz hohem anzunehmenden Dunkelfeld), nach der Lungenmanifestation, mit ca. 30%, die zweithäufigste krankheitsassoziierte Todesursache bei SSc-Patienten darzustellen.⁹⁹ Das 5 Jahres Mortalitätsrisiko steigt dabei signifikant an mit klinischer Manifestation der Herzbeteiligung (d.h. mit Beginn kardialer Symptome, insbesondere bei Nachweis von Rhythmusstörungen).¹⁰⁰

Die Prävalenz klinisch manifester SSc-pHI variiert, je nach verwendeter Definition und Kohorte, zwischen 7 - 39%.¹⁰¹ In einer Autopsie Studie [n=58 SSc vs. n=58 nicht-SSc *matched control*] (CAVE: keine sicher Ausschluss sekundär oder unabhängiger kardialer

Erkrankung) zeigte sich eine myokardiale Fibrose bei 81% aller SSc Patienten (vs. 55% der Geschlechts und Alters angepassten nicht-SSc Kontrollen).¹⁰²

Berücksichtigt man – so wie es die WSF/HFA Definition der SSc-pHI verlangt auch subklinische Fälle – so muss eine noch höhere Prävalenz angenommen werden. Tatsächlich konnten z.B. in einer Studie, in der 83 kardial asymptomatische SSc-Patienten und 44 gesunde Kontrollen gezielt mittels Kardio-MRT Untersuchung auf eine subklinische kardiale Pathologie gescreent wurden, in 21% der SSc-Patienten (vs. 0% der gesunden Probanden) sogenannte fokale Late Gadolinium Anreicherung (*engl.: late gadolinium enhancement, LGE*) Läsionen mit nicht ischämischem Muster gefunden werden, welche Hinweis auf eine Herzbeteiligung darstellen.¹⁰³

Verschiedene Risikofaktoren stehen in Zusammenhang mit der Entwicklung einer SSc-pHI. Dazu gehören unter anderem eine dcSSc (bzw. eine Positivität für Anti-Scl70 oder Anti-RNAPIII-Autoantikörper), ein männliches Geschlecht, ein höheres Alter sowie eine längere Erkrankungsdauer. Zudem ist bekannt, dass ein hoher mRSS mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung relevanter Organbeteiligungen, einschließlich SSc-pHI, assoziiert ist. Die Herzbeteiligung stellt dabei keineswegs eine Spätmanifestation der SSc dar, sondern kann schon früh im Erkrankungsverlauf in Erscheinung treten.^{104–}

¹⁰⁶ Eine aktuelle epidemiologische Studie der EUSTAR Kohorte konnte zudem u.a. folgende weitere Risikofaktoren für das Vorliegen einer SSc-pHI identifizieren: Teleangiektasien, gastrointestinale Beteiligung oder Arthritis. Das Vorliegen von florider Arthritis (“geschwollene Gelenke”) stellte zudem einen Risikofaktor für einen Progress der SSc-pHI dar.¹⁰⁷

1.2.3. Klinische Aspekte der SSc-pHI

1.2.3.1. Symptomatik der SSc-pHI

Die SSc-pHI kann prinzipiell alle Bestandteile des Herzens betreffen. Dies umfasst:

- Myokard: Myokardfibrose und Myokarditis können zu einer Einschränkung der Pumpfunktion mit konsekutiver Herzinsuffizienz führen. Häufig zeigen Patienten mit manifester Erkrankung jedoch über lange Zeit eine erhaltene bzw. nahezu normwertige linksventrikuläre Ejektionsfraktion ($EF \geq 50\%$) – es liegt also das Bild einer Herzinsuffizienz mit erhaltener EF (*engl. heart failure with preserved ejection fraction, HFpEF*) vor.
- Erregungsbildungs-/und Erregungsleitungssystem: Durch fibrotischen Umbau im Bereich des Erregungsbildungs- und -leitungssystems kommt es zu Störung der normalen Reizleitung mit daraus folgenden Arrhythmien unterschiedlichster Art bis hin zum plötzlichen Herztod.
- Perikard: Eine Entzündung des Herzbeutels (Perikarditis) kann zu thorakalen Schmerzen und Atemnot führen. In Folge der Entzündung kann es zu einem Perikarderguss kommen, welcher in seltenen Fällen hämodynamisch relevant wird durch Kompression des Herzens und damit Beeinträchtigung des regulären Herzzyklus.

- Endokard: Eine Fibrosierung im Bereich des Endokards tritt klinisch insbesondere im Bereich der Herzklappen in Erscheinung, deren Funktion durch die höhere Steifigkeit des Gewebes gestört wird. (Klappenvitium)
- Koronargefäße: Auch im Bereich des Herzens werden typische (funktionelle und anatomische) mikroangiopathische Veränderungen beobachtet, welche typische Beschwerden einer koronaren Gefäßerkrankung – auch in Abwesenheit einer relevanten Koronarsklerose/-stenose der drei großen Koronargefäße – nachahmen können. Typische Symptome der Myokardischämie sind thorakale Schmerzen (zu Beginn insbesondere bei Belastung).

108,109

Die klinische Präsentation der SSc-pHI ist (wie in **Abb. 3**) zusammengefasst) also äußerst heterogen. Der Verlauf der Organbeteiligung ist dabei in vielen Fällen über lange Zeit klinisch inapparent. Nicht selten werden jedoch auch vorhandene Beschwerden in Folge einer Herzbeteiligung klinisch „übersehen“ bzw. nicht richtig gedeutet, da klare Algorithmen für Screening und Diagnostik der SSc-pHI bislang fehlen.¹¹⁰

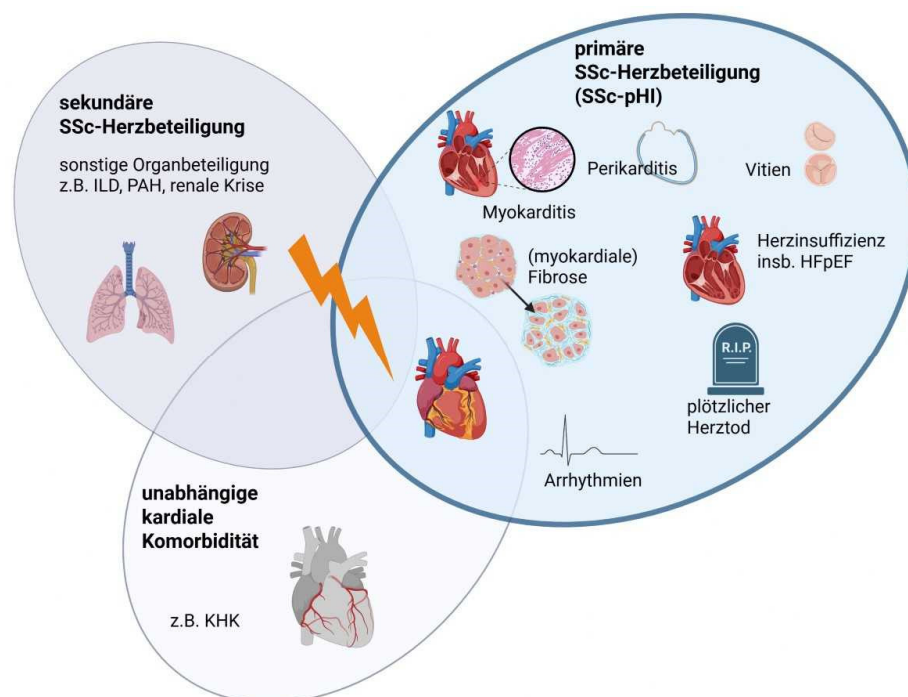


Abb. 3 Klinik und Abgrenzung der primären Herzbeteiligung bei systemischer Sklerose (SSc-pHI): In der Praxis gestaltet sich die Abgrenzung der SSc-pHI, sekundärer Herzbeteiligungen (infolge anderer Organbeteiligungen) sowie SSc-unabhängiger kardialer Komorbiditäten oft sehr schwierig. Die klinischen Komplikationen der SSc-pHI sind dabei, wie dargestellt, sehr heterogen. SSc-pHI: *engl. SSc primary heart involvement*, dt. primäre Herzbeteiligung bei SSc; SSc: *engl. systemic sclerosis*, dt. Systemische Sklerose; ILD: *engl. interstitial lung disease*, dt. interstitielle Lungenerkrankung; PAH: Pulmonalarterielle Hypertone; KHK: koronare Herzerkrankung; HFpEF: *engl. heart failure with preserved ejection fraction*, dt. Herzinsuffizienz mit erhaltener Pumpfunktion [Created in BioRender. Stütz, A. (2025) <https://BioRender.com/4ub6nzb>]

1.2.3.2. Diagnostik der SSc-pHI

Da die klinische Manifestation der SSc-pHI zudem, wie oben bereits dargestellt, in der individuellen Ausprägung sehr mannigfaltig ist und das Auftreten von kardialen Symptomen übereinstimmend als schlechtes prognostisches Zeichen gewertet wird, kommt dem gezielten Screening nach subklinischer SSc-pHI eine besondere Bedeutung zu.

Im Jahr 2023 wurden von der WSF und HFA, aufbauend auf der Konsensusdefinition und einer umfangreichen Metaanalyse, erstmals ein Expertenübereinkommen zu Screening, Diagnostik und *follow-up* Untersuchung der SSc-pHI veröffentlicht.¹¹⁰

Eine sorgfältige Anamnese, in welcher gezielt nach kardialen Beschwerden (z.B. Dyspnoe, thorakalen Schmerzen, Reduktion der kardiorespiratorischen Belastbarkeit mit schnellerer Erschöpfung, periphere Ödeme, Schwindel, Synkopen oder Palpitationen) gefragt wird, sollte demnach fester Bestandteil jeder Visite sein. Die reguläre Verlaufskontrolle von hoch-sensitivem Troponin T (hsTropT) und N-terminalem pro-B-Typ natriuretischem Peptid (NT-proBNP), ergänzend zum jährlichen (bzw. bei Risikopatienten halbjährlich) Screening mit Ruhe-EKG und TTE hat sich in der Praxis ebenfalls als hilfreich erwiesen – obgleich ein sicherer Ausschluss einer SSc-pHI hiermit nicht möglich ist. Bei persistierendem klinischem Verdacht ohne erhärtenden Befund, sollte daher in jedem Fall eine weiterführende Diagnostik erfolgen.^{111,112} Ein großes Problem in der Interpretation kardialer Befunde stellt die fehlende Spezifität für die SSc-pHI dar. Grundsätzlich sollten daher stets auch allgemeine kardiovaskuläre Risikofaktoren erhoben werden und bei kardialen Beschwerden differenzialdiagnostisch immer auch eine Genese durch eine SSc unabhängige kardiale Komorbidität - insbesondere eine KHK - sowie eine sekundäre kardiale Belastung (im Besonderen in Folge einer PAH) differenzialdiagnostisch sicher ausgeschlossen werden. Die Notwendigkeit einer Links-/ggf. Rechtsherzkatheteruntersuchung sollte daher in jedem Fall interdisziplinär besprochen werden.¹¹⁰

NT-proBNP und hsTropT sind etablierte kardiale Biomarker. NT-proBNP ist ein Fragment des Vorhormons proBNP welches als Reaktion auf Druckveränderungen im Myokard freigesetzt wird. Erhöhte Werte weisen auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz oder kardialen Stress hin (Referenzwerte sind abhängig von Alter und Laborstandard). Kardiale Troponine werden intrazellulär in Kardiomyozyten exprimiert und sind Bestandteil der elektromechanischen Kopplung. Erhöhte Troponinwerte im Serum weisen auf einen Untergang von Herzmuskelzellen hin. Besonders ist die hohe Sensitivität einer Dynamik von hsTropT für jegliche kardiale Pathologie mit Myokardzelluntergang. Eine Erhöhung von NTproBNP und/oder hsTropT im Serum von SSc-Patienten war mit einer schlechteren Prognose assoziiert.¹¹³ Ein Problem der etablierten kardialen Biomarker im Blut ist die geringe Spezifität für die SSc-pHI.

Für die bessere klinische Differenzialdiagnostik ist die Suche nach neuen, spezifischeren Biomarkern für die SSc-pHI daher wichtig. Es gibt einige Forschungsanstrengungen in

diese Richtung, so scheinen u.a. Angiopoietin-2, Osteopontin und TRAIL (=Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand) im Serum von SSc-Patienten mit kardialer Dysfunktion verändert zu sein und waren darüber hinaus (in Kombination mit bekannten klinischen Risikofaktoren) unabhängige Risikofaktoren für eine erhöhte Mortalität.¹¹⁴

Eine Schwierigkeit in der Diagnostik der SSc-pHI besteht darin, dass SSc-Patienten mit manifester Herzbeteiligung über lange Zeit eine normwertige Ejektionsfraktion ($EF \geq 50\%$) zeigen.¹¹⁵ Aus diesem Grund sollte (insbesondere bei erhöhtem NT-proBNP) in der Echokardiographie gezielt nach Hinweisen auf eine vorhandene diastolische Dysfunktion (z.B. erhöhtes E/E'-Verhältnis > 15), als Surrogat-Parameter eines erhöhten linksventrikulären enddiastolischen Füllungsdrucks (quasi als Kompensationsmechanismus zum Erhalt der Auswurfleistung), geachtet werden. Spezialmessungen, wie z.B. die Abnahme der Mitralanulus (e') Velocity (entsprechend einer Abnahme der Relaxationsfähigkeit in der frühen Füllungsphase) konnten bei SSc-Patienten ebenfalls mit einem erhöhten Sterberisiko in den nächsten Jahren korreliert werden. Auch konnten spezielle *strain imaging* Messungen bei Patienten mit SSc eine deutlich erniedrigte globale und regionale longitudinale systolische Dehnung (als Maß für eine reduzierte Kontraktilität des Herzens) nachweisen.¹¹⁶

Die echokardiographische Untersuchung der SSc-pHI ist keineswegs trivial und die Standardisierbarkeit erschwert. Einen großen Fortschritt in der bildgebenden Diagnostik der SSc-pHI hat daher die zunehmende Etablierung der kardialen Magnetresonanztomographie (MRT) -Bildgebung in der klinischen Praxis mit sich gebracht. Zunehmend mehr Patienten mit SSc-pHI können mittels dieser MR-Technik in frühem Stadium diagnostiziert werden. Dabei ist die MR-Technologie durch die nicht-invasive und strahlungsfreie, zeitgleiche Beurteilung von Entzündung, Fibrose und myokardialer Funktion anderen Techniken deutlich überlegen. Da die erhobenen Werte abhängig von den Einstellungen am verwendeten Gerät sind, sollte eine Verlaufskontrolle stets im gleichen MR-Tomographen erfolgen. Die Interpretation der Daten erfordert eine gewisse Erfahrung ist jedoch prinzipiell einfacher zu standardisieren als die TTE. Auflösung und Kontrast der Technik haben sich in den letzten Jahren stetig verbessert, so dass die Beurteilung von Herzfunktion und -kinetik, Bestimmung der Ejektionsfraktion und Wandbewegungsstörungen heute mit guter räumlicher Differenzierung erfolgt. In speziellen Perfusions-Sequenzen lässt sich die Myokardperfusion messen.¹¹⁷ In der T2 gewichteten Sequenz lässt sich die Ödemkomponente als hyperintenses Signal darstellen und Quantifizieren (STIR/T2) Im sogenannten *Late Gadolinium Enhancement* (LGE) stellt sich fibrotisch verändertes Myokardgewebe (subepikardial oder intramyokardial), in Folge veränderter Relaxationseigenschaften hyperintens dar. Auch abnorme T1 Zeiten weisen im sogenannten T1 Mapping auf Fibrose, Infiltration oder andere Gewebeveränderungen im Myokard hin.^{118,119}

Für die gezielte Analyse der Fibrosekomponente in der SSc wurde im Rahmen von Studien in den letzten Jahren auch die [Ga-68]Ga-FAPI-04-PET-CT Bildgebung

eingesetzt. Wie auch in anderen betroffenen Organen zeigt sich bei der SSc-pHI eine Anreicherung des [68Ga]Ga-FAPI-04 Tracers spezifisch in Arealen mit aktiver (myokardialer) Fibrose. Insbesondere in der Verlaufsbeurteilung scheint das FAPI-PET CT dabei offensichtlich sensitiver als das Kardio-MRT in der Darstellung dynamischer Aktivitätsveränderungen im Prozess der myokardialen Fibrosierung zu sein. Ein Nachteil der PET-CT Technik ist sicherlich die Strahlenbelastung und (zumindest aktuell noch) die geringe Verfügbarkeit.¹¹⁸

Als diagnostischer Goldstandard der SSc-pHI, durch die Möglichkeit der direkten Beurteilung möglicher histopathologischer Veränderungen im Myokard, wird formell bis dato jedoch weiterhin die invasive endomyokardiale Biopsie (EMB) gehandelt – obgleich die Wertigkeit und Notwendigkeit der Untersuchung zuletzt zunehmend kontrovers diskutiert wird. In der Regel erfolgt der Zugang im Herzkatheter endovaskulär. Mit einem Biopom werden unter Röntgenkontrolle kleine Gewebeproben aus dem rechten Ventrikel entnommen. Das Prozedere ist mit einem relevanten Risiko für Komplikationen assoziiert. Neben Blutungen, Infektion oder Thromboembolien, kann es auch zu (lebensbedrohlichen) Arrhythmien und der Perforation des Hohlorgans kommen. Dies sind sicherlich Gründe, weshalb eine EMB heutzutage nur bei hochgradigem Verdacht durchgeführt wird. Aufgrund der inhomogenen fokalen Verteilung von fibrotischen/entzündlichen Veränderungen in der SSc-pHI besteht zudem ein signifikantes Risiko für ein falsch negatives Sampling. Durch eine MRT-Bildgebung vor Punktion kann das Punktionsgebiet besser eingegrenzt werden. Im weiteren Verlauf wird noch einmal in Detail auf charakteristische histopathologische Veränderungen eingegangen. An dieser Stelle sei jedoch schon einmal erwähnt: Die beobachteten Veränderungen in den bislang angewandten Standard histopathologischen Untersuchungen des Myokards sind keineswegs spezifisch für die SSc-pHI. Dennoch kann die histopathologische Beurteilung bei der differenzialdiagnostischen Überlegung unterstützen. Das Grading der Inflammation und Staging der Fibrose hilft nicht nur die Krankheitsaktivität einzuschätzen, sondern ermöglicht zudem eine Rationale bei der Therapieauswahl (eher antiinflammatorisch/immunsuppressiv versus primär antifibrotisch) zu treffen. Ein weiterer großer Vorteil der EMB stellt zudem der sichere Ausschluss einer infektiösen Myokarditis mittels PCR (*engl. Polymerase Chain Reaction*, dt. Polymerase Kettenreaktion) und anderer histopathologischer Differenzialdiagnosen z.B. einer kardialen Amyloidose dar.^{119,120} In Anbetracht der Fortschritte im Bereich der Bildgebung muss die diagnostische Wertigkeit der EMB in Zukunft von Fachkreisen erneut kritisch diskutiert werden. Insbesondere zur Verlaufsbeurteilung scheint die Kardio-MR Bildgebung der EMB zumindest vom Nutzen-Risiko Verhältnis klar überlegen zu sein.¹²¹

1.2.3.3. Therapie der SSc-pHI

Eine etablierte kausale Therapie der SSc-pHI existiert bis dato nicht. Auch besteht nur wenig Evidenz bzgl. der spezifischen Wirksamkeit der bei der SSc eingesetzten medikamentösen Therapien auf die Herzbeteiligung, da in den meisten klinischen Studien lediglich Haut- und/oder Lungenbeteiligung als Endpunkte betrachtet wurden,

so dass Evidenz bzgl. Wirksamkeit auf die SSc-pHI im Wesentlichen auf Einzelfallberichten beruht.

Während GC, in der Regel in Kombination mit anderen immunsuppressiven Basistherapien, standardmäßig bei (nicht SSc assoziierter) autoimmuner Myokarditis eingesetzt werden, herrscht durchaus Uneinigkeit über die Wertigkeit des Einsatzes von GC bei SSc-pHI. Während die UK Systemic Sclerosis Study group eine Empfehlung für den Einsatz von GC in moderater Dosis (<15 mg/d) - in Kombination mit CYC Pulstherapie bei Nachweis von aktiver Myokarditis, moderat-schwerer linksventrikulärer Dysfunktion (in Folge der SSc-pHI) oder lebensgefährlichen Arrhythmien – ausspricht, sehen andere Experten kein ausreichend belegtes Nutzen-Risikoverhältnis für den regelhaften Einsatz von Steroiden bei SSc-pHI.^{112,122} Bezüglich des Gebrauchs von CYC konnte in Einzelfallserien eine Besserung der pSSc-HI dokumentiert werden. Es sollte jedoch, insbesondere bei höher dosierter Anwendung die Gefahr von Kardiotoxizität des CYCs bedacht werden. Auch für andere immunsuppressive Basistherapien, wie beispielsweise AZA, MTX, MMF, RTX und TOC, gibt es positive Berichte über eine Verbesserung der kardialen Beteiligung bei SSc. Allerdings fehlt es noch an ausreichender Erfahrung, um eine fundierte Stratifizierung der SSc-pHI-Patienten in der Therapieplanung vornehmen zu können.¹²² Einig ist man sich bezüglich der Notwendigkeit einer suffizienten anti-entzündlichen Behandlung in der frühen (prädominant inflammatorischen) Phase der SSc-pHI.

Eine spezifisch antifibrotische Behandlung der SSc-pHI ist nicht zugelassen bislang. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass der antifibrotische Effekt von Nintedanib nicht nur auf die Lunge begrenzt ist, sondern sich auch positiv auf die Herzbeteiligung auswirkt. So konnte in ersten Studien eine signifikante Abnahme des extrazellulären myokardialen Volumens (gemessen im Kardio-MRT) zwischen Nintedanib behandelter Gruppe und Kontrolle gesehen werden.¹²³ (Prä)klinische Daten zur Herzfibrose unterstützen die Idee, Nintedanib grundsätzlich zur antifibrotischen Therapie bei pathologischem kardialen *Remodeling* einzusetzen.¹²⁴ Auch für das Antifibrotikum Pirfenidon – zugelassen bislang nur für die Idiopathische Pulmonale Fibrose – wurde jüngst eine antifibrotische Wirkung in myokardialem Gewebe postuliert.¹²⁵

Neben der bestmöglichen immunsuppressiven und antifibrotischen Therapie der Grunderkrankung ist eine enge interdisziplinäre rheumatologisch-kardiologische Betreuung der SSc-pHI Patienten wichtig für die Therapieplanung. Das derzeit angestrebte (realistische) Ziel der Therapie, ist die Stabilisierung der Grunderkrankung, um kardiale Komplikationen zu verhindern sowie eine Steigerung der Lebensqualität durch die supportive Linderung kardial-bedingter Beschwerden.

Hinsichtlich einer gezielten Behandlung der vaskulopathischen Komponente der SSc-pHI besteht kein etabliertes Behandlungskonzept.

Eine adäquate Therapie kardiovaskulärer Risikofaktoren sollte, wie oben bereits diskutiert, bei allen SSc-Patienten erfolgen – ist bei Patienten mit SSc-pHI aber sicherlich im Besonderen relevant.

Die supportive kardiologische Therapie muss sich an der individuell präsentierten kardialen Symptomatik orientieren. Behandlung von Herzinsuffizienz, Rhythmusstörungen, Perikarditis, Vitien oder koronare Mikroangiopathie sollten, unabhängig von der Genese in Folge der SSc, lege artis (also gemäß den etablierten Leitlinien) durchgeführt werden. Dabei sollte auf spezifisch potenziell unerwünschte Arzneimittelwirkungen bei SSc (z.B. Lungenfibrose unter Amiodaron oder Vasospasmus unter Betablockern) geachtet werden.

Die optimale Therapie der Herzinsuffizienz richtet sich nach Einschränkung der EF. Die wichtigsten Bausteine der optimalen medikamentösen Therapie der Herzinsuffizienz mit reduzierter linksventrikulärer Pumpfunktion (HFrEF) sind Angiotensin-Rezeptor-Neprilysin-Inhibitoren, *sodium glucose transporter 2* -Inhibitoren, Betablocker und Mineralokortikoidrezeptorantagonisten.

Auch Herzrhythmusstörungen können medikamentös kontrolliert werden. Darüber hinaus stehen interventionelle Möglichkeiten zur Behandlung von Arrhythmien zur Verfügung, welche abhängig von Art der Arrhythmie, Schweregrad, Symptomen und individuellen Patientenfaktoren eingesetzt werden. Insbesondere die Kardiale Resynchronisationstherapie sowie der Einsatz eines automatischen implantierbaren Kardioverter-Defibrillators (AICD) sollte bei SSc-pHI Patienten mit malignen ventrikulären Rhythmusstörungen erwogen werden. Das Risiko für einen plötzlichen Herztod ist bei SSc-pHI signifikant erhöht. Grundsätzlich scheint die Gefahr für ventrikuläre Arrhythmien mit dem Grad an Fibrose (z.B. gemessen am Grad des LGE im Kardio-MRT) zu korrelieren.¹²⁶ Die Implantation eines AICDs sollte als Sekundärprävention nach einem Herzstillstand sowie als Primärprävention bei hohem Risiko eines plötzlichen Herztodes (Nachweis maligner ventrikulärer Rhythmusstörungen, EF < 35% oder Nachweis von signifikantem LGE im Kardio-MRT) unbedingt erwogen werden.¹²⁷

Aufgrund der bislang fehlenden kurativen Therapie der SSc stellt sich in schweren Fällen von schwerster SSc-pHI mit terminaler Herzinsuffizienz die Frage nach der Indikation für eine Herztransplantation. In der Literatur finden sich zu dem Thema bislang nur Einzelfallstudien zu kombinierter Herz/Lungen-Transplantation bzw. (deutlich seltener) zu isolierter Herztransplantation bei Patienten mit SSc. Eine sorgfältige Patienten Selektion ist für das Outcome nach Transplantation essenziell (u.a. Alter, Allgemeinzustand, sonstige Organbeteiligung, Risiko für Infektionen durch intensivierete Immunsuppression). Für junge Patienten mit schwerer SSc-pHI sollte die Möglichkeit einer Herztransplantation als Rescue-Strategie rechtzeitig interdisziplinär erörtert werden.¹²⁸

1.2.4. Histopathologie und Pathophysiologie der SSc-pHI

1.2.4.1. Histopathologie der SSc-pHI

Es besteht nur wenig aktuelle Literatur zur Histopathologie der Herzbeteiligung bei SSc. Zur SSc-pHI im Speziellen (entsprechend der oben aufgeführten Konsensusdefinition) existieren quasi keine histopathologischen Studien. Da in den meisten histopathologischen Studien zur Herzbeteiligung bei SSc eine dezidierte Erklärung über die verwendete Definition fehlt, ist die Metaanalyse der Ergebnisse, in Folge der vermutlich großen Heterogenität der subsumierten (kardialen) Pathologien, schwierig. In Autopsien konnten myokardiale Veränderungen in 81% aller obduzierten SSc-Patienten gefunden werden. (vs. 26% in der Kontrollgruppe).¹²⁹

Eine Übersicht über gefundene histopathologische Veränderungen in der SSc-pHI wurde von Ross et al. (2019) erstellt. Aus der Metaanalyse wurde (im Rahmen der Möglichkeiten) Literatur ausgeschlossen, welche sich klar auf eine sekundäre kardiale Beteiligung z.B. im Rahmen einer PAH oder unabhängige kardiale Morbidität bezog. **Tabelle 2** -basierend auf Ross et al. (2019)- fasst die wesentlichen Veränderungen zusammen.¹³⁰ Summa summarum lässt sich in den beschriebenen Veränderungen die charakteristische pathophysiologische Triade der SSc erkennen: Vaskulopathie, Inflammation und Fibrose.

Tabelle 2 Zusammenfassung histologischer Charakteristika der primären Herzbeteiligung bei systemischer Sklerose (SSc-pHI)

Herzvergrößerung und Erhöhung des Herzgewichtes Dilatation und Hypertrophie der Herzkammern
Myokardiale Fibrose - Kollagenablagerungen + Fibroblasten-Infiltration - Patchy und/oder diffuses Muster - Vorkommen verschiedener morphologischer Muster - o Interstitielle Fibrose - o Perivaskuläre Fibrose - o Replacement Fibrose (nach Kardiomyozyten Untergang) - Fibrose im Bereich des Erregungsbildungs/-leitungssystem
Myokardiale Nekrose - Kontraktionsbandnekrose (als Zeichen für Ischämie-Reperfusions-Schaden) - Fokale Nekrose Areale ohne Bezug zum Verlauf epikardialer Arterien
Degenerative Atrophie von Herzmuskel
Abnormalitäten kleiner Arteriolen - Konzentrische Intimahypertrophie und/oder -proliferation - Thrombotische Okklusion
Nachweis von Infarkten in Abwesenheit von KHK u.a. anteroseptal, intramural
Myokardiale Inflammation - Perivaskulär und interstitielle Lokalisation - Infiltrate (Lymphozyten, Makrophagen, Plasmazellen, Mastzellen) - Kriterien für Myokarditis erfüllt
Valvuläre Läsionen

Abkürzungen: SSc-pHI: *engl. SSc primary heart involvement*, dt. primäre Herzbeteiligung bei SSc; SSc: *engl. systemic sclerosis*, dt. systemische Sklerose, KHK: koronare Herzerkrankung

1.2.4.2. Kardiale Vaskulopathie

Neben okklusiven Veränderungen konnte u.a. mittels Thallium-201 SPECT Bildgebung funktionell auch ein (reversibles) myokardiales Raynaud Phänomen nachweisen werden. Provoziert durch Belastung oder Kälte Stimulation wurde ein vasospastisch bedingter Abfall der kardialen Perfusion beobachtet.¹³¹ In einer anderen (prospektiv angelegten) japanischen Studie konnte in 29% der teilnehmenden SSc-Patienten ohne klinischen Hinweis auf Herzbeteiligung, mittels Kontrast-TTE, ein myokardiales Raynaud dargestellt werden. Interessanterweise zeigte sich im 7-Jahres *follow-up*, dass der Nachweis einer schweren myokardialen Perfusionsstörungen zum Studienbeginn ein starker Prädiktor für die langfristige Entwicklung einer systolischen linksventrikulären Dysfunktion zu sein scheint. Die Untersuchung des kardialen Raynaud konnte sich bis dato nicht in der klinischen Praxis durchsetzen, obgleich mit dieser Untersuchung ggf. frühzeitig Patienten mit hohem Risiko für die Entwicklung einer SSc-pHI identifiziert werden könnten.¹³²

Histopathologisch finden sich in der SSc-pHI im Myokard passend dazu, so genannten Kontraktionsbandnekrosen, welche Evidenz für abgelaufene Ischämie-Reperfusionsschäden darstellen. Daneben finden sich auch fokale Areale mit Kardiomyozyten-Untergang, welche den konsekutiven Verlust der kardialen Funktion bedingen. Im Gegensatz zu Kardiomyozyten Zelltod bei KHK entspricht das Muster bei SSc-pHI nicht dem Verlauf der großen Koronargefäße, sondern zeugt von einer diffusen Mikroangiopathie. Bei SSc-Patienten (ohne belegte SSc-pHI) konnte in einer Studie, im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe, eine deutlich reduzierte Koronarreserve nach Applikation von vasodilatatorischen Substanzen (wie z.B. Adenosin i.v.) gefunden werden.¹³³

1.2.4.3. Kardiale Inflammation.

Die spezifische Charakteristik der Zusammensetzung der entzündlichen Infiltrate im Myokard in der SSc-pHI, im Vergleich zu anderen Formen nicht viraler Myokarditis (z.B. Herzbeteiligung im Rahmen anderer (nicht SSc) systemischer Autoimmunerkrankungen (a-HI) oder idiopathischer Natur (i-HI)), ist bislang nicht detailliert untersucht worden. Auch über die räumliche Verteilung und Interaktion unterschiedlicher Immunzellpopulationen in der SSc-pHI existiert bislang kein fundiertes Wissen. Beschrieben werden perivaskulär und interstitiell lokalisierte Infiltrate, überwiegend aus mononukleären Zellen - insbesondere T-Lymphozyten, (in geringerem Maße) auch B-Zellen bzw. Plasmazellen sowie Makrophagen. Histopathologisch lässt sich in den Standard histopathologischen Untersuchungen in vielen Fällen eine klassische Myokarditis (wie im folgenden Abschnitt erläutert) nachweisen.¹³⁴

Auch die inflammatorischen Signalwege in der SSc-pHI sind bislang nicht ausreichend untersucht worden. Interleukin-1 (IL-1) scheint in der SSc-pHI möglicherweise eine wichtige Rolle zu spielen und im Myokard sowohl Entzündungsprozesse als auch Fibroblasten-Aktivierung zu fördern.¹³⁵ Auch in anderen Herzerkrankungen wird dem

Zytokin eine relevante Rolle zugeschrieben. Für den therapeutischen Einsatz von Anti-IL-1 inhibierender Therapien in der Behandlung der SSc-pHI besteht bislang noch keinerlei Evidenz. In anderen Fällen von Herzversagen unterschiedlicher Genese mit begleitender inflammatorischer Komponente konnte jedoch bereits eine Verbesserung des kardialen Outcomes unter IL-1 Blockade, mit Reduktion der Inflammations- und Fibroelast, dokumentiert werden.¹³⁶

Die pathophysiologische Relevanz von Autoantikörpern ist in der SSc bislang, wie bereits erörtert, nicht abschließend erklärt. Neben den bekannten SSc-spezifischen Autoantikörpern konnten in einer größeren SSc Kohorte (zum großen Teil ohne diagnostizierte Herzbeteiligung!) anti-Herz-spezifische Autoantikörper (AHA) und anti-Glanzstreifen (*engl. intercalated disc*) Autoantikörper (AIDA), welche als serologischer Marker auch bei anderen Formen von autoimmuner Herzbeteiligung z.B. kardiale Sarkoidose nachgewiesen wurden, gefunden werden. Die Prävalenz von AHA und AIDA war bei SSc-Patienten signifikant höher (AHA in 49% und AIDA in 56%) als bei Patienten mit anderen nicht-immunvermittelten Herzerkrankungen und in der Normalbevölkerung (jeweils weniger als 5%). Der Nachweis von AHA war dabei mit einer höheren Mortalität und dem Risiko für Herzverschlechterung sowie mit dem Auftreten von kardialen Ereignissen assoziiert. Auch diese Befunde weisen auf eine erhebliche, oft unerkannt bleibende Belastung, durch SSc-pHI hin. Der prädiktive Wert der regulären Bestimmung von AHA und AIDA im Screening auf SSc-pHI muss jedoch noch weiter untersucht werden.¹³⁷

1.2.4.4. Myokardiale Fibrose

Das Problem der myokardialen Fibrose ist keineswegs SSc-spezifisch. Die zunehmende Fibrosierung des Myokards ist (neben dem ischämisch bedingten Untergang der Herzmuskelzellen) maßgeblich für die kardiale Funktionsstörung in der SSc-pHI verantwortlich.

Die besondere Charakteristik der kardialen Fibrose und die Rolle der Mesenchymzell-Nische in der SSc-pHI ist bislang unzureichend untersucht und verstanden worden. Histopathologisch lassen sich in der EMB bei SSc-pHI typischerweise alle drei klassischen Formen von kardialer Fibrose finden: interstitielle Fibrose, perivaskuläre Fibrose und die sogenannte *Replacement* Fibrose -also dem Ersatz von abgestorbenen Kardiomyozyten-Arealen durch fibrotisches Bindegewebe. Insofern stellt die SSc-pHI (trotz seltener Epidemiologie und spezieller Pathophysiologie) durchaus eine prototypische Erkrankung für das Studium der kardialen Fibrose im Allgemeinen dar. Wie auch die entzündlichen Infiltrate ist die Fibrose dabei nicht homogen verteilt, sondern weist ein fleckförmiges Mustre (*patchy pattern*) auf, was zu einem signifikanten Risiko für einen falsch-negativen histopathologischen Befund bei blinder EMB führt. In histopathologischen Untersuchungen von SSc-EMBs zeigten sich fibrotische Bereiche mit Flächenanteilen zwischen 8% und 32% (vs. 3% in der Kontrollgruppe).¹³⁸ Histopathologisch können fibrotische Areale mit klassischen Bindegewebsfärbungen wie z.B. Masson's Trichrom oder Picro-Sirius-Rot evaluiert werden.

Doch auch nicht-invasiv lässt sich die Fibrose durch die, oben bereits ausgeführten, diagnostischen Möglichkeiten der Kardio-MRT Bildgebung inzwischen gut darstellen und quantifizieren. Hier zeigt sich oft ein diffuses subendokardiales Muster der LGE-enhanced T1-W, welches sich mit der typischen mikroangiopathischen Vaskulopathie der SSc erklären lässt. Auch im T1 Mapping stellt sich i.d.R. eine diffuse Fibrose dar. Zudem ist die *extracellular volume fraction* erhöht in der SSc-pHI.¹³⁹ Eine relevante Komplikation des fibrotischen Umbaus im Bereich von Erregungsbildungs- und Leitungsstrukturen im Herzen stellen Arrhythmien dar. MRT-Studien konnten für die SSc-pHI (im Gegensatz zu anderen fibrotischen Myokarderkrankungen) bislang zwar keine sichere Assoziation zwischen dem Ausmaß der kardialen Fibrose im Kardio-MRT und der klinischen Arrhythmie>Last beweisen.¹⁴⁰ Jedoch konnte z.B. in der Studie von *Giacomo De Luca et al. (2020)* durchaus eine Korrelation zwischen Ausmaßes der detektierten kardialen Fibrose in der EMB und der Anzahl an gemessenen ventrikulären Extrasystolen in der 24h Langzeit-EKG Messung hergestellt werden, welche ein etablierter prognostischer Risikofaktor für plötzlichen Herztod bzw. erhöhter kardialer Mortalität darstellen. Verglichen wurden in der Studie Patienten mit SSc-pHI und Patienten mit Nachweis von i-HI und a-HI In allen Fällen wurde die inflammatorische Myokarderkrankung in der EMB histologisch gesichert. Dabei konnte in der SSc-pHI eine signifikant höhere Ausdehnung des myokardialen Fibrose-Areals (18.8% vs. 16.5% bei a-HI und 10.3% bei i-HI) als auch ein höherer mittlerer Fibrose-Score (2.3 vs. 1.4 bei a-HI und 0.7 bei i-HI) festgestellt werden. Entgegen der intuitiven Erwartung konnte kein relevanter Unterschied in Ausmaß der Fibrose zwischen SSc-Patienten mit früher und SSc-Patienten mit längerer Erkrankungsdauer festgestellt werden (16.9% vs. 15,2%). Hingegen korrelierte das prozentuale Fibroseareal im Myokard klar mit dem Ausmaß der Hautfibrose (gemessen mittels mRSS).¹³⁴

1.3. Hintergrund: allgemeine kardiale Pathologie

1.3.1. Myokarditis – Inflammation des Herzmuskels

Als Myokarditis wird im Allgemeinen eine Entzündung des Myokards beschrieben, welche in den meisten Fällen akut verläuft. In besonderen Fällen, in denen die entzündliche Stimulation bestehen bleibt kann es jedoch auch zu einem (sekundär) chronischen Verlauf mit zunehmend akkumulierendem Schaden im Myokard und der Entwicklung einer chronischen inflammatorischen Kardiomyopathie kommen.¹⁴¹

Die akute Myokarditis hat in über der Hälfte der Fälle eine (bekannte) infektiöse Ursache. Dabei kann es sowohl zu einer direkten Entzündung des Myokards durch kardiotope Erreger als auch zu einer indirekten (parainfektiösen) Immunreaktion auf eine Infektion kommen. Am häufigsten sind virale Erreger (z.B. Enteroviren, Herpesviren, Parvoviren, Adenoviren, Coronaviren) für die Entzündungsreaktion verantwortlich. Aus diesem Grund sollte, gemäß *European Society of Cardiology (ESC) Guidelines*, standardmäßig eine Virus-PCR aus einer EMB zur differenzialdiagnostischen Klärung angefertigt werden. Andere Erreger (bakteriell, mykotisch, protozoisch) sind

deutlich seltener ursächlich nachweisbar. Bei persistierender Inflammation im Myokard oder wiederkehrenden entzündlichen Prozessen ist eine fortschreitende Schädigung des Herzmuskels mit Zunahme fibrotischer Veränderungen und konsekutiv progredienten kardialen Beschwerden und Funktionseinschränkungen zu beobachten. Der Übergang zwischen akut und chronischer Phase ist insbesondere bei nicht-infektiösen Formen oft schwer abzugrenzen. In der Gruppe nicht-infektiöser inflammatorischer Kardiomyopathien sind autoimmunologische Prozesse häufig im Rahmen von (rheumatologischen) Systemerkrankungen z.B. Vaskulitiden oder Kollagenosen (inklusive SSc) zu finden. Andere Ursachen stellen außerdem alloimmunologische Prozesse nach Herztransplantation oder entzündliche Reaktionen auf exogene Substanzen z.B. kardiotoxische Medikamente, Immuncheckpoint-Inhibitoren oder Schwermetalle dar. In nicht wenigen Fällen von akuter Myokarditis oder chronisch inflammatorischer Kardiomyopathie lässt auch nach ausgedehnter Diagnostik keine Erklärung für die Inflammation finden. Diese Fälle werden als „idiopathisch“ klassifiziert.¹⁴²

Klinisch hat sich (mit Ausnahme von sehr fulminant verlaufenden Fällen) die Kardio-MRT Bildgebung inzwischen praktisch als first-line Diagnostik etabliert. Mit den Lake Louise-Kriterien stehen für das Kardio-MRT inzwischen sehr gut etablierte Kriterien zur Diagnose von inflammatorischen Herzerkrankungen zur Verfügung.¹⁴³

Jedoch gilt formell die Durchführung einer EMB dennoch weiterhin als diagnostischer Goldstandard, da die histopathologische Stratifizierung sowohl therapeutisch als auch prognostisch relevant ist.¹⁴⁴ Für das Grading der Myokarditis, also die Einschätzung des Schweregrades der Entzündung, existieren unterschiedliche Scores. Die 1987 festgelegten DALLAS-Kriterien definieren und klassifizieren die akute Myokarditis wie folgt: *“[...] process characterized by inflammatory infiltrate of the myocardium with necrosis and/or degeneration of adjacent myocytes, not typical of ischemic damage associated with coronary artery disease. [...] The inflammatory infiltrates should be subclassified as lymphocytic, eosinophilic, neutrophilic, giant cell, granulomatous, or mixed. The amount of inflammatory infiltrate and its distribution should be described as mild, moderate or severe and focal, confluent, or diffuse, respectively. The amount and distribution of fibrosis, if present, can be described similarly and should be characterized as endocardial, preplacement, or interstitial.”*¹⁴⁵ Obgleich die DALLAS Kriterien noch oft Erwähnung finden, existieren in der Praxis zur quantitativen Evaluation der Infiltrate inzwischen deutlich detailliertere Kriterien zur Auswertung der EMB. Heute wird standardmäßig ergänzend zur konventionellen Histologie (Hämatoxylin-Eosin und Bindegewebsfärbung wie z.B. Massons Trichrom) noch eine immunhistochemische (IHC) Färbung der Schnitte durchgeführt, wobei in der Regel mindestens folgende Antikörper zur Immunphänotypisierung eingesetzt werden: CD45 (Leukozyten allgemein), CD3 (T-Zellen), CD4 (T-Helfer-Zellen), CD8 (zytotoxische T-Zellen), CD20 (B-Zellen) und CD68 (Makrophagen-Population). In der Regel gilt der Nachweis von >14 Leukozyten/mm² (mit Nachweis von >7 T-Zellen/mm²) beim Erwachsenen als etablierter *cut-off* Wert um eine Myokarditis sicher

diagnostizieren zu können. **Tabelle 3** gibt ein etabliertes Schema zum Myokarditis-*Grading* wider.¹⁴⁵

1.3.2. Kardiale Fibrose

Das Herz weist, verglichen mit anderen Organen, ein geringes Regenerationspotenzial auf, was zur Folge hat, dass jegliche Form von myokardialen Schaden zu kaum reversiblen Reparaturprozessen führt. Unabhängig von der Art des schädigenden Reizes (z.B. Ischämie, Druckbelastung, Entzündung) ist die folgende gemeinsame Endstrecke mit der Entwicklung von kardialer Fibrose ähnlich und das zentrale pathologische Korrelat jeglicher (fortgeschrittener) Herzerkrankung. Unter kardialer Fibrose versteht man die pathologische Akkumulation kollagenhaltigen Bindegewebes im Myokard. Im physiologischen Zustand ist die Menge an ECM Kollagen im Myokard sehr gering. Für die Funktion des Herzens ist die störungsfreie elektromechanische Kopplung der Kardiomyozyten untereinander, sowie mit den Zellen des Reizbildungs-/und Leitungssystem, essenziell. Durch das fibrotische „Narbengewebe“ wird die Funktion des Herzens auf allen Ebenen beeinträchtigt. Fibrotisches Gewebe im Herzen ist jedoch keineswegs homomorph, sondern weist in seiner Zusammensetzung eine Heterogenität auf z.B. im Grad der Quervernetzung zwischen den Kollagenfibrillen auf, welche sowohl zu Unterschieden in der Steifheit des myokardialen Gewebes führen kann als auch relevant hinsichtlich der klinischen Einschränkungen von linksventrikulärer Funktion und in Bezug auf die Prognose zu sein scheint.¹⁴⁶

Morphologisch lassen sich folgende Fibrose Formen im Herzen unterscheiden: interstitielle Fibrose (also die Akkumulation von fibrotischer ECM im Raum zwischen den Kardiomyozyten), perivaskuläre Fibrose (also die Entwicklung von fibrotischem Bindegewebe spezifisch um die Blutgefäße im Myokard) sowie die Replacement-Fibrose (bei welcher der Raum der untergegangenen Kardiomyozyten durch fibrotische Matrix ersetzt wird). Funktionseinschränkung und Klinik korrelieren mit der zunehmenden Ausdehnung des fibrotischen Umbaus des Organs.¹⁴⁷

Histopathologisch erfolgt das *Staging*, also die Einschätzung des irreversiblen Schadens einer entzündlichen Herzerkrankung, wie bereits in den ursprünglichen DALLAS Kriterien vorgeschlagen, anhand der Begutachtung des Vorhandenseins von fibrotischem Umbau. (Siehe dazu exemplarisch, das von Basso et al. (2013) vorgeschlagene Myokarditis-*Staging* dargestellt in **Tabelle 4**)¹⁴⁸

Trotz enormen medizinischen Bedarfs existiert bislang keine etablierte kausale Therapie der kardialen Fibrose, welche den Prozess aufhalten oder rückgängig machen könnte. Auch die pathophysiologischen Vorgänge und im Besonderen das Zusammenspiel von Immunzellen, vaskulären Zellen und Stromazellen im Herzen, welche zum Prozess der Fibrosierung führen, sind bis dato nur im Ansatz verstanden.

Es wurde an anderer Stelle bereits auf die grundsätzliche Pathophysiologie der Fibrose am Beispiel der SSc eingegangen. Es ist jedoch wichtig zu betonen, dass ebenso wie die Bindegewebshomöostase im Gesunden (entsprechend den unterschiedlichen

Anforderungen) höchst organspezifisch gesteuert wird, auch die Fibrosebildung im pathophysiologischen Kontext selbstverständlich in der Umgebung des jeweiligen Zielorgans erfolgt. So tragen im Herzens neben allgemein profibrotisch wirkenden Signalwegen (wie z.B. TGF- β) im Speziellen auch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) – hier insbesondere Angiotensin II und Endothelin – oder die Stimulation über das beta-adrenerge System sowie mechanische Stressfaktoren (wie z.B. Drucküberlastung) zur vermehrten Kollagensynthese und Hemmung der Kollagenolyse im Myokard bei.¹⁴⁹

Wie bereits an anderer Stelle erörtert, sind Fibroblasten keineswegs eine homogene Population. Stromazellen sind in höchstem Maße an die vorliegenden Erfordernisse angepasst. Es existiert eine enorme Heterogenität zwischen Organen, aber auch durchaus innerhalb eines Organs z.B. zwischen rechten und linken Ventrikel, bzw. verschiedenen Bereichen in der Wand des selben Ventrikels.¹⁵⁰ Kardiale Fibroblasten zeichnen sich sicherlich im besonderen Maße durch ihre hohe Mechanosensitivität aus. Mechanische Eigenschaften des Gewebes beeinflussen die profibrotischen Signalwege dabei in einer Art, sich selbst verstärkenden, positivem Feedbackloop. Auch die mechanische Beanspruchung des Myokards durch die hämodynamische Vor- und Nachlast beeinflusst den Aktivierungsstatus kardialer Fibroblasten stetig.¹⁵¹ Im Herzen scheinen neben residenten Fibroblasten und perivaskuläre Zellen u.a. auch Endothelzellen, Perizyten, epikardiale Zellen sowie Zellen aus der hämatopoetischen Zellreihe zu Myofibroblasten transdifferenzieren zu können.¹⁵²

Aufgrund ihrer Schlüssel-Rolle im Prozess des pathologischen kardialen *Remodeling* (im Rahmen verschiedenster Herzerkrankungen) erhielten die kardialen Fibroblasten in den letzten Jahren neue Aufmerksamkeit. Die große Herausforderung jeglicher therapeutischen Intervention ist das pathologische *Remodeling*/respektive den Fibroseprozess einzuschränken, jedoch die Abläufe der physiologischen Wundheilung nach einem Schaden nicht zu unterbinden. Die Regenerationsfähigkeit nach myokardialer Schädigung nimmt im Laufe des Lebens kontinuierlich ab. Während nach perinataler/neonataler kardialer Schädigung durchaus eine *restitutio ad integrum* beobachtet wurde, kommt es beim Erwachsenen (Menschen) oft zu einer Defektheilung mit Fibrosereaktion. Grundsätzlich folgen die Abläufe (Inflammation, Proliferation und *Remodeling*) zwar stets dem gleichen Muster, die fehlende Kardiomyozytenproliferation nach myokardialer Schädigung im adulten Organismus hat jedoch die Disruption des Heilungsprozesses mit folgender fibrotischer Narbenbildung zur Folge.¹⁵³

Tabelle 3 Myokarditis *Grading* nach Basso et al (2013) ¹⁵⁴

Myokarditis <i>Grading</i> (Last von Kardiomyozyten Schaden und Inflammation)		
(A) Kardiomyozyten Schaden	Nicht vorhanden	0
	Fokal vorhanden	1
	Multifokal vorhanden	2
(B) Interstitielle Inflammation	≤ 7 T-Zellen/mm ²	0
	>7 bis ≤ 14 T-Zellen/mm ²	1
	>14 T-Zellen /mm ²	2
(C) Endokardiale Beteiligung (inflammatorisch, thrombotisch)	Nicht vorhanden	0
	Vorhanden	1
	Maximale Punktzahl	5

Tabelle 4 Myokarditis *Staging* nach Basso et al. (2013)¹⁵⁴

<i>Staging</i> (Bewertung des Ausmaßes an irreversibler Fibrosierung)		
(A) Interstitielle/Replacement Fibrose	Nicht vorhanden	0
	>10 bis $\leq 20\%$	1
	>20 bis $\leq 40\%$	2
	$>40\%$	3
(B) Subendokardiale Fibrose	Nicht vorhanden	0
	vorhanden	1
(C) Endokardiale Fibroelastose	Nicht vorhanden	0
	vorhanden	1
	Maximale Punktzahl	5

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Die SSc ist pathophysiologisch durch die Triade aus Autoimmunität, Vaskulopathie und der konsekutiven (für die Erkrankung charakteristischen) systemischen Fibrosereaktion gekennzeichnet. Obgleich die SSc-pHI zu den zentralen Organkomplikationen der SSc zählt und maßgeblich zur krankheitsassoziierten Mortalität beiträgt, ist sie klinisch und wissenschaftlich bislang unzureichend charakterisiert worden. Im Vergleich zu anderen entzündlichen Erkrankungen des Myokards - z.B. Herzbeteiligung im Rahmen anderer Autoimmunerkrankungen (a-HI) oder idiopathischer Genese (i-HI)- ist die SSc-pHI klinisch mit einer schlechteren Prognose assoziiert.¹³⁴ Histologische Untersuchungen konnten in der SSc-pHI dabei eine schwerere Fibrose im Vergleich zu entzündlichen Myokarderkrankungen anderer Ätiologien (a-HI, i-HI) nachweisen¹³¹. Es wird angenommen, dass diese aggressiv-verlaufende Fibrosereaktion, maßgeblich das schlechtere klinische Outcome der SSc-pHI bedingt. Auch eine Studie von Mueller et al., welche 25 Patienten mit SSc-pHI prospektiv untersuchte, kam zum Schluss, dass das Risiko für die Entwicklung von Komplikationen („Ereignisrate“) maßgeblich mit dem Grad an Inflammation und Fibrose in der EMB korrelierte (Inflammation: Grad 0-1: 18.2%, Grad 2: 25%, Grad 3-4: 50%, Fibrose: Grad 1: 11%, Grad 2: 33%, Grad 3: 42%).¹⁵⁵

Ein besseres Verständnis der organspezifischen Pathogenese und der zugrundeliegenden Veränderungen im Myokard auf zellulärer Ebene in der SSc-pHI sind für einen Fortschritt in der Diagnostik und die zukünftige Entwicklung wirksamer Therapien essenziell.

Neue Omics-Methoden, wie beispielsweise die *Imaging Mass Cytometry* (IMC, dt. bildgebende Massenzytometrie) bieten die Möglichkeit, die zelluläre Zusammensetzung von Geweben mit räumlicher Auflösung in bisher ungeahnter Tiefe zu untersuchen. Dies eröffnet neue Chancen, insbesondere auch für die Erforschung seltener Erkrankungen bzw. Organkomplikationen wie der SSc-pHI.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die, unseres Wissens, erstmalige tiefergehende explorative Analyse der zellulären Zusammensetzung und Identifikation von pathophysiologisch relevanter Zellcluster (sowie Einblick in die räumlich zellulären Netzwerke) in der SSc-pHI, im direkten Vergleich mit anderen (nicht viralen) entzündlichen Myokarderkrankungen (a-HI und i-HI) mittels IMC.

Das Myokard weist im Vergleich zu anderen Geweben ein stark eingeschränktes Regenerationspotenzial auf. Bei einer schwerer akuten oder chronisch-schädigenden Stimulation kommt es zu einem pathologischen *Remodeling*, das mit der Induktion von myokardialer Fibrose einhergeht. Diese Fibrosereaktion stellt eine maladaptive Antwort des Herzgewebes dar, die langfristig die strukturelle und funktionelle Integrität des Herzens beeinträchtigt. Aufgrund des Fehlens einer wirksamen Therapie, stellt die myokardiale Fibrose - als Endstrecke sämtlicher schwerer Herzerkrankung- eines der drängendsten ungelösten Probleme der modernen Kardiologie dar.

Das Studium der SSc-pHI bietet, in Folge der ausgeprägten und prototypischen Fibrosereaktion im Myokard, in dieser Hinsicht eine einzigartige Gelegenheit, über die spezifische Pathophysiologie, auch grundlegende Mechanismen der myokardialen Fibrosebildung besser zu verstehen und kann dazu beitragen neue allgemeine Zielstrukturen zur Behandlung von myokardialer Fibrose zu identifizieren.

2. Material und Methoden

2.1. Patienten: Gewebeproben und klinische Charakteristik

2.1.1. Gewebeproben

Es wurden in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete (FFPE, *engl. Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*) Myokard-Gewebeproben verwendet, die nach der histopathologischen Begutachtung diagnostischer EMB vom rechten Ventrikel verblieben waren.

Es wurden insgesamt Myokardbiopsien von 21 verschiedenen Patienten verwendet:

- Elf Patienten mit primärer Herzbeteiligung bei SSc. [*in die finale Analyse nach Qualitätskontrolle der „Färbung“ wurden zehn Patienten mit SSc-pHI eingeschlossen]
- Als Kontrollen:
 - o Neun Patienten mit idiopathischer Myokarditis [*in die finale Analyse nach Qualitätskontrolle der „Färbung“ wurden neun Patienten mit i-HI eingeschlossen]
 - o Neun Patienten mit Herzbeteiligung im Rahmen einer gesicherten systemischen Autoimmunerkrankung (nicht SSc). [*in die finale Analyse nach Qualitätskontrolle der „Färbung“ wurden sieben Patienten mit a-HI eingeschlossen]

In allen Proben wurde, als Teil der regulären klinischen Diagnostik, mittels PCR-Testung eine virale Myokarditis differenzialdiagnostisch ausgeschlossen.

*Nach Beurteilung der Qualität der Färbung mussten im Verlauf 2x a-HI Proben aus der weiteren Analyse ausgeschlossen werden. (Aufgrund eines Datenfehlers in den Rohdaten wurde zuvor bereits eine SSc-pHI Probe aus der Präprozessierung ausgeschlossen).

Die Gewebeproben wurden in Zeitraum von 2013 bis 2022 gesammelt in Kooperation mit Herrn Ass. Prof. Giacomo De Luca (Milan, Italien). Es liegt ein gültiges Ethikvotum für die Verwendung der Proben im Rahmen des hier dargestellten Projektes vor. Ethikvotum (Medizinische Fakultät, HHU): # 2023-2561

Ein Teil des verwendeten Biomaterials (bzw. Schnitte derselben Paraffinblöcke) wurde bereits in folgender Publikation von unseren Kooperationspartnern aufgearbeitet:

De Luca G, Campochiaro C, De Santis M, et al. Systemic sclerosis myocarditis has unique clinical, histological and prognostic features: a comparative histological analysis. *Rheumatology (Oxford)*. 2020;59(9):2523-2533. doi:10.1093/rheumatology/kez658

2.1.2. Klinische Charakteristika

Alle SSc Patienten erfüllen die ACR/EULAR Kriterien für SSc.¹⁵⁶ Da der Sammelzeitraum der Proben größtenteils vor der Veröffentlichung der WSF/HFA Definition der SSc-pHI liegt wurden die Daten retrospektiv nach bestem Wissen und Gewissen auf die Erfüllung der neuen Kriterien für die SSc-pHI überprüft.

Tabelle 5 bietet eine Übersicht über die in die Analyse eingeschlossenen Patienten-Gruppen:

Tabelle 5 Patientencharakteristika

SSc-pHI					
ID	Sex	Alter	Ak	Typ (mRSS)	Rheumat. Therapie
SSc_1	F	36	Anti-RNP	dc (13)	Pred, HCQ; AZA
SSc_2	F	63	Anti-Centromer	lc (4)	Pred, Ciclosporin
SSc_3	F	32	Anti-PM-Scl100, Anti-Centromer	lc (8)	/
SSc_4	F	39	Anti-Centromer	sine (0)	Colchicin
SSc_5	F	58	Anti-Th/To	lc	/
SSc_6	M	31	unbekannt	unbekannt	MTX
SSc_7	F	52	unbekannt	unbekannt	/
SSc_8	M	58	Anti-Fibrillarin	dc (13)	MMF
SSc_9	M	61	Anti-Scl70	dc (17)	MMF
SSc_10	F	59	RNP-Sm	lc (0, max.10)	Pred, MMF
a-HI					
ID	Sex	Alter	Ak	Erkrankung	Rheumat. Therapie
a-HI_1	M	55	Anti-PL12	ASyS	/
a-HI_2	M	59	/	Sarkoidose	/
a-HI_3	F	44	Anti-TIF1gamma	UCTD	/
a-HI_4	M	56	Anti-EJ1	UCTD	/
a-HI_5	F	53	Anti-PM-Scl100	UCTD	/
a-HI_6	M	77	Anti-JO1	ASyS	MMF
a-HI_7	F	30	Anti-DNS	SLE	Pred, HCQ, MMF
iHI					
ID	Sex	Alter	Erklärende entzündl. Systemerkrankung		Rheumat. Therapie
i-HI_1	M	23	Nein (Psoriasis)		/
i-HI_2	M	74	Nein		/
i-HI_3	M	41	Nein		/
i-HI_4	M	74	Nein		/
i-HI_5	F	42	Nein		/
i-HI_6	F	43	Nein		/
i-HI_7	M	67	Nein		/
i-HI_8	M	51	Nein		/
i-HI_9	M	46	Nein		/

Abkürzungen: ID, Patientenidentität; Sex, Geschlecht; M, Mann; F, Frau; Ak, Autoantikörper; mRSS, *modified Rodnan Skin Score*; Rheumat., rheumatologische; SSc-pHI, Systemische Sklerose primäre Herzbeteiligung; a-HI, Herzbeteiligung im Rahmen einer (nicht SSc) Herzbeteiligung; i-HI, idiopathische Myokarditis; dc, diffus-kutan; lc, limitiert-kutan; Pred, Prednisolon; HCQ, Hydroxychloroquin; AZA, Azathioprin; ASyS, Antisynthetase Syndrom; SLE, Systemischer Lupus Erythematoses; UCTD, undefinierte Kollagenose (engl. undefined connective tissue disease)

Bei der vergleichenden Betrachtung der Entitäten fällt auf, dass die Gruppen nicht gematcht sind. In der SSc-pHI Kohorte befinden sich mit 70% deutlich mehr Frauen als in den Kontroll-Kohorten (a-HI: 43%, i-HI: 22%). Desweiteren ist das mittlere Alter der SSc-pHI Kohorte mit 48,9 Jahren jünger als das der anderen Gruppen (a-HI: 53,4 Jahre, i-HI: 51,2 Jahre). Auch waren in der SSc-pHI Gruppe zum Zeitpunkt der EMB deutlich mehr Patienten bereits immunsuppressiv anbehandelt.

2.2. Imaging Mass Cytometry (IMC)

2.2.1. Einführung Technik

Die *Imaging Mass Cytometry* (IMC, dt.: bildgebende Massenzytometrie) wurde als Erweiterung der klassischen Massenzytometrie (auch: CyTOF „*Cytometry by Time of Flight*“) entwickelt.

Die klassische Massenzytometrie ermöglicht - seit Einführung im Jahr 2009 - die gleichzeitige Quantifizierung von mehr als 40 verschiedenen Proteinen auf Einzelzellebene in Zellsuspensionen mithilfe metallischer Isotope, die als Marker mit Antikörpern gekoppelt sind. Eingesetzt werden dabei schwere Metalle, welche in biologischen Systemen normalerweise nicht vorkommen. Ein wesentlicher Vorteil gegenüber herkömmlichen fluoreszenzbasierten Verfahren (z.B. FACS, engl. *fluorescence-activated cell sorting*) besteht in der Vermeidung spektraler Überlappung und dem Problem der Autofluoreszenz. Dies führt zu einem geringeren Hintergrundrauschen und ermöglicht eine sehr hohe Sensitivität der Analyse.¹⁵⁷

Die IMC ermöglicht -gegenüber der klassischen CyTOF Technologie- erstmals die parallele Erfassung von räumlichen Informationen zur Proteinexpression von bis zu 40 verschiedenen Markern in einem Gewebeschnitt (*multiplexed imaging*) mit relativ hoher Auflösung. Auf diese Weise wird eine neue Tiefe in der Untersuchung der zellulären Zusammensetzung und der räumlichen Interaktionen im natürlichen Gewebekontext ermöglicht.

Die IMC-Technologie wurde maßgeblich von der Gruppe von Prof. Bernd Bodenmiller und Prof. Detlev Günther (beide ETH Zürich, Schweiz) vorangetrieben und 2014 erstmals in der Anwendung auf Tumorgewebe publiziert.¹⁵⁸ Kommerziell wird das Messsystem von Standard BioTools™ (früher Fluidigm Corporation) zur Verfügung gestellt. Das Verfahren kombiniert das Prinzip der Massenspektrometrie (Helios™ Massenzytometer) mit einem neuartigen Hyperion™ Tissue Imager, welcher die zusätzliche räumliche Dimension der Daten ermöglicht.

Das Gewebe wird hierzu mit einem Antikörper-Mix (aus über 40 individuell Metallisotopen-markierten Antikörpern) „gefärbt“. Für die nukleäre Färbung steht zusätzlich ein kationischer Nukleinsäure-Interkalator zur Verfügung (191 Iridium/193 Iridium).¹⁵⁹ Während der Messung erfolgt mittels hochenergetischem UV Laser die rasterförmige Ablation des Gewebes. Das verdampfte Material wird in die Plasmaeinheit eines Massenspektrometers geleitet, in welchem die atomisiert und ionisierten Partikel nach ihrem Massen-Ladungsverhältnis (m/z) separiert und detektiert werden. Zwar werden sämtliche Proteine (und damit auch die Antikörper) durch den Laser denaturiert - doch die Metall-Label verbleiben. Da jedes im Panel eingesetzte Metallisotop einzigartig in seiner Masse ist, kann durch die individuelle Markierung aus den detektierten Metall-Ionen indirekt Rückschluss auf die Proteinexpression im abladierten Gebiet gezogen werden. Ionen mit einem Masse-zu-Ladungsverhältnis <80 werden durch einen Quadrupol-Filter eliminiert, so dass im Wesentlichen die eingesetzten Metall-Label übrigbleiben. Auf diese Weise wird ein Massen-Spektrum erzeugt, welches einem Pixel von $1\ \mu\text{m}^2$ entspricht. Durch repetitive Laserschüsse (ca. 200Hz) und x/y-Achsen gesteuerte Bewegung des Objektträgers, wird auf diese Weise mit fortlaufender Abtragung Pixel für Pixel ein „Pseudobild“ konstruiert.¹⁶⁰

Für eine Übersicht über das grundsätzliche Prinzip der Datenerfassung mittels IMC-Technologie siehe **Abb. 4**.

Die zentralen Schritte, welche bei der Durchführung eines IMC Projektes durchlaufen werden, sollen im Folgenden erläutert werden:

1. Panel Design
 - Validierung unkonjugierter Antikörper mittels Immunfluoreszenz (IF)-Färbung
 - Markierung unkonjugierter Antikörper mit Metall-Isotopen
 - Titration und Validierung sämtlicher Antikörper mittels IMC im Zielgewebe
2. IMC „Färbung“ des Zielgewebes
3. IMC Messung
4. IMC Analyse

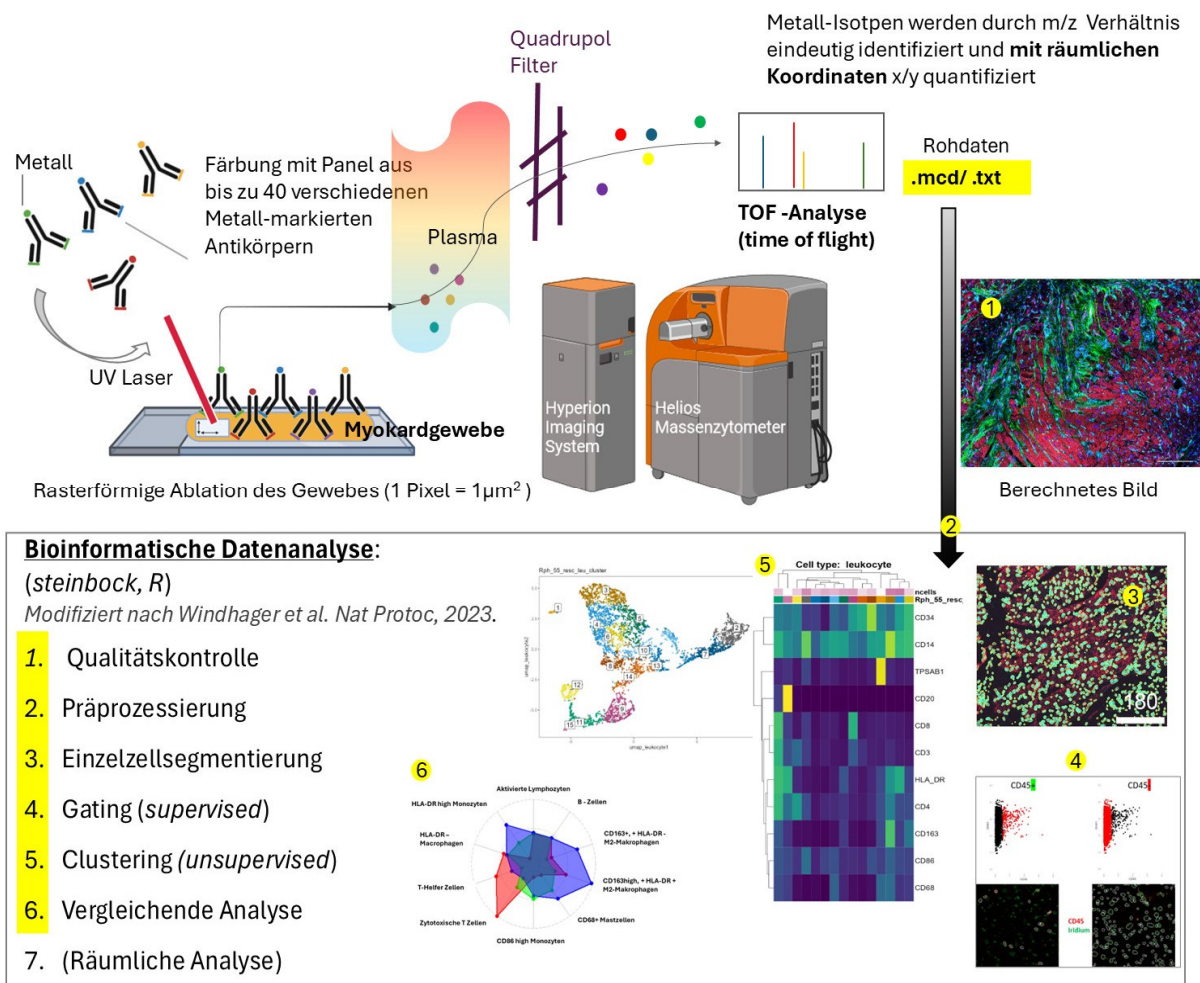


Abb. 4 Prinzip der Datenerfassung mittels Imaging Mass Cytometry (IMC): Das Myokard-Gewebe wird mit einem Antikörper-Mix aus 40 verschiedenen Metall-markierten Antikörpern „gefärbt“. Während der Messung erfolgt im Hyperion *Imaging System* mittels UV-Laser die rasterförmige Ablation des Gewebes. Das verdampfte Material wird in die Plasmaeinheit eines Helios Massenspektrometers geleitet. Ein Quadrupol Filter lässt praktisch nur die eingesetzten schweren Metall-Marker durch. Es erfolgt eine Analyse der atomisiert und ionisierten Partikel nach ihrem Massen-Ladungsverhältnis (m/z). Da jedes im Panel eingesetzte Metallisotop einzigartig in seiner Masse ist, kann indirekt Rückschluss auf die Proteinexpression im abladierten Gebiet gezogen werden. Die Auflösung beträgt $1\mu\text{m}^2$. Aus den Rohdaten (.mcd- und .txt-file) kann ein Bild berechnet werden - auch stellen die Daten den Ausgangspunkt der bioinformatischen Analyse dar.

Abkürzungen: IMC: engl. *Imaging Mass Cytometrie*, dt. bildgebende Massenspektrometrie; Ak: Antikörper; UV: ultraviolett; TOF: engl. „time of flight“, .mcd-file: „mass cytometry data“-Dateiformat; .txt-file: Text-Dateiformat

[Teile der Abbildung wurden mit BioRender erstellt: Created in BioRender. Stütz, A. (2025) <https://BioRender.com/pfaazx6>, <https://BioRender.com/5wakku>]

2.2.2. Panel Design

2.2.2.1. Übersicht Panel

Für die vorliegende Arbeit wurde basierend auf umfangreicher Literaturrecherche und aufbauend auf (teilweise) bereits publizierten Panel zur Studie der Hautbeteiligung bei SSc (u.a. Györfi et al. 2021¹⁶¹, Rigau et al. 2024¹⁶², Rigau et al. 2024¹⁶³) in einem explorativen Ansatz ein herzspezifisches Panel zur detaillierten Analyse der Immunzellen, Stromazellen und vaskulären Zellen entworfen und die entsprechenden Zielantigene definiert.

Zusätzlich zu zellspezifischen Markern wurden Marker zur späteren Zellsegmentierung in das Panel integriert. Zur Markierung des Nukleus wurde neben einem Anti-Histon-Antikörper auch 191/193 Iridium verwendet. Bei der Markierung der Zellgrenzen sollte ein kommerziell erworbenes *IMC Cell Segmentation Kit* (ICSK1/2, Fluidigm/ Standard Bio Tools) unterstützen.

Grundsätzlich stehen für eine Reihe von gängigen Antigenen bereits mit einem Metallisotop konjugierte (*pre-labeled*) Antikörper zum Kauf zur Verfügung (Fluidigm/ Standard BioTools). Darüber hinaus kann praktisch jeder unkonjugierte Antikörper mittels kommerziellen Kit mit dem Metall-Isotop der Wahl markiert werden.

Ein Überblick über das fertige Panel bietet Tabelle 6.

2.2.2.2. Validierung unkonjugierter Antikörper mittels IF

Grundsätzlich wurden alle unkonjugierten Antikörper, die im finalen Panel verwendet wurden, vor der Konjugation mit dem gewünschten Metallisotop erfolgreich in IF getestet. Es wurden jeweils drei verschiedene Verdünnungen eingesetzt, um das *staining pattern* bestmöglich beurteilen zu können. Zum Ausschluss unspezifischer Bindung wurde jeweils eine unspezifische Isotyp -(Immunglobulin) Kontrolle mitgefärbt.

Da in der Arbeitsgruppe parallel an verschiedenen IMC-Projekten gearbeitet wurde und die eingesetzten Antikörper teilweise bereits in anderen Projekten erfolgreich validiert worden waren, wurde lediglich für die „neuen“, d.h. insbesondere die herzspezifischen Antikörper im Panel selbstständig die Validierung mittels IF durchgeführt. Für die kooperative Zusammenarbeit sei an dieser Stelle Dr. Aleix Rius Rigau, Veda Devakumar und Bilgesu Safak Tümerdem gedankt.

Die FFPE (Haut für allgemeine Antigene bzw. Myokard-Gewebe für herzspezifische Antigene) wurden nach Erhitzen im Trockenofen auf 55°C für 60min in Xylol-Bädern [Carl Roth, Ord# 9713.3] (3x 10min) deparaffinisiert und in den anschließenden Ethanol Bädern [Ethanol ≥99,8 %, Carl Roth, Ord.#1HPH.1] in absteigender Konzentration langsam rehydriert (je 5min Ethanol: 100% - 100% - 90% - 80%). Anschließend wurden die Schnitte für 5 Minuten in ddH₂O und PBS [PBS 10x: Gibco, Ord#: 70011-036] gewaschen. Für das Epitope-Retrieval wurden die Schnitte für 30min in 96° C heißem 1x Tris-EDTA-Tween Puffer im Wasserbad inkubiert. (Je zwei Schnitte in einem 50ml Falcon. [Für 1l Tris-EDTA Puffer (10x): 12,1g Tris base [Merck, Ord#: 10708976001], 3,7g EDTA [Carl Roth, Ord#: 8043.2], pH Anpassung auf pH 9. In den 1x Tris EDTA Puffer

wird Tween 20 [Sigma Aldrich, Ord#: P9416-50ML] in einer Konzentration 1:1000 hinzugefügt]. Im Anschluss kühlten die Schnitte etwa 20min ab, bevor sie für 10min in PBS gewaschen wurden. Der Antigen-Blocking Schritt erfolgte mit 2% BSA [Carl Roth, Ord#: 8076.3] in PBS für 1h bei Raumtemperatur. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (also der Antikörper, dessen Spezifität getestet werden sollte). Um das Gewebe wurde dazu ein Kreis mit einem PAP Pen [Hölzel Biotech, IHC-SPM0928] gezeichnet. Der primäre Antikörper (für Details siehe Tabelle 6) wurde in 2%BSA/PBS verdünnt [in der Regel 1:50 – 1:400] und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4C° inkubiert. Am Folgetag wurden die Schnitte für 5min in PBS mit 0,2% Tween20 gewaschen, gefolgt von 2x 5min in PBS. Im Anschluss wurde der sekundäre Antikörper (gewählt entsprechend der Spezies des primären Antikörpers und des gewünschten Fluoreszenz-Spektrums, verdünnt in 2% BSA/PBS für 1h bei Raumtemperatur in einer dunklen Kammer inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Waschschritt mit PBS (3 x 5min), gefolgt von ddH2O (5min) und Gegenfärbung mit DAPI [Santa Cruz, Ord.# sc-3598], verdünnt 1:800 in PBS für 10min. Im Anschluss wurden die Schnitte in ddH2O gewaschen und mit Fluoreszenz Mounting Medium [Agilent, Ord.#S3023] und einem Coverslip [Thermo Scientific Menzel, Ord.# 17244914] eingedeckt. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte unter dem IF-Mikroskop [Zeiss Axio Observer 7 fluorescence microscope] betrachtet und die Validität und Spezifität der Färbung beurteilt. Als Kontrolle dienten publizierte Informationen zu den Zielantigenen.

2.2.2.3. Markierung unkonjugierter Antikörper mit Metall-Isotopen

Die unkonjugierten Antikörper [siehe Tabelle 6] wurden mittels eines kommerziell erworbenen Kits [Maxpar X8 Antibody Labeling Kit, Fluidigm/ Standard BioTools] mit dem gewünschten Metallisotop konjugiert. [siehe Tabelle 6] Das von der Firma bereitgestellte Protokoll wurde unverändert durchgeführt. (siehe Abb. 5)

Die Reagenzien wurden entsprechen der Empfehlungen gelagert. Da das Protokoll für eine Antikörpermenge von 100 µg optimiert ist, wurde stets die entsprechende Menge für das *Labeling* verwendet. Entsprechend den Herstellerangaben wurde darauf geachtet, dass der unkonjugierte Antikörper weitgehend Glycerol- und *carrier-free* (insbesondere kein Protein z.B. bovines Serumalbumin oder Gelatin) formuliert wurde. Die genaue Zusammensetzung der eingesetzten Puffer ist zum Großteil Firmengeheimnis. (Maxpar R-Buffer [Ord.# S0001], Maxpar C-Buffer [Ord.# S0003], Maxpar W-Buffer [Ord.#S0005], Maxpar L-Buffer [Ord.#S0007]) Das Protokoll besteht im Wesentlichen aus verschiedenen, teilweise Temperatur sensitiven, Inkubationsschritten gefolgt von Zentrifugation mit Filtereinheiten [Millipore Sigma, Ord.# UFC500308 (3 kDa) und Ord.# UFC505008 (50 kDa)] zur anschließenden Volumenreduktion. Für Details wird auf das Hersteller-Protokoll: Maxpar Antibody Labeling User Guide (PRD002 Rev14) – Kapitel 3: Maxpar X8 Antibody Labeling Kits verwiesen. https://www.imc.unibe.ch/unibe/portal/fak_medizin/micro_imc/content/e987276/e988978/MaxparAntibodyLabelingUserGuidePRD002REV14.pdf ¹⁶⁴

Grundsätzlich wurden folgende Schritte durchgeführt.

- 1a) Das X8 Polymer [Ord.# S00009] wurde mit dem gewünschten Metall beladen [siehe Tabelle 6] und im Anschluss durch mehrere Wasch-Filtrationszentrifugations-Schritte aufgereinigt.
- 1b) Parallel wurde der primäre Antikörper [siehe Tabelle 6] mittels Filterzentrifugation im Volumen reduziert. Im Anschluss wurden, durch Inkubation mit 4mM TCEP [TCEP 0.5 M: Sigma Aldrich, Ord.# 646547-10X1M; PBS: Sigma Aldrich Ord.# D8537-24X500ML] organische Disulfidbrücken reduziert und im Anschluss ebenfalls durch mehrere Wasch-Filtrationszentrifugations-Schritte aufgereinigt und erneut im Volumen reduziert.
- 2) Im Anschluss erfolgte in einem Inkubationsschritt die Konjugation des Metall-beladenen X8 Polymers (welches eine sulfidreaktive Maleimid-Gruppe enthält) an die freien SH Gruppen der Antikörper. Nach Abschluss der Inkubation wurden die nun Metall-konjugierten Antikörper durch wiederholte Wasch-Filtrationszentrifugations-Schritte aufgereinigt.
- 3) Die IgG Menge wurde mittels Nanophotometer [Implen NanoPhotometer P300] quantifiziert.
- 4) Der konjugierte Antikörper wurde erneut gewaschen sowie Volumen reduziert und anschließend mit „Antibody Stabilizer“ [Boca Scientific, Ord.# 131050] + 0,05% Natriumazid [Sigma Aldrich, Ord.# 71289-5G] zu einer finalen Konzentration von 0.5 mg/mL verdünnt.
- 5) Aufbewahrung der konjugierten Antikörper erfolgte wie empfohlen in Protein LoBind Tubes [Eppendorf, Ord.# 022431081] bei 4C°. Um das Panel zu erweitern, wurde neben den im Kit erhältlichen Metallen zusätzlich 89Y und 115 In (beides Sigma Aldrich, Details siehe Tabelle 6) verwendet. Die Metalle wurden zu Beginn zu einer Stoffmengenkonzentration von 50mM, entsprechend der Lanthanid Metalle im Kit, in L-Buffer gelöst. Das weitere Prozedere erfolgte nach demselben Protokoll, wie oben beschrieben.

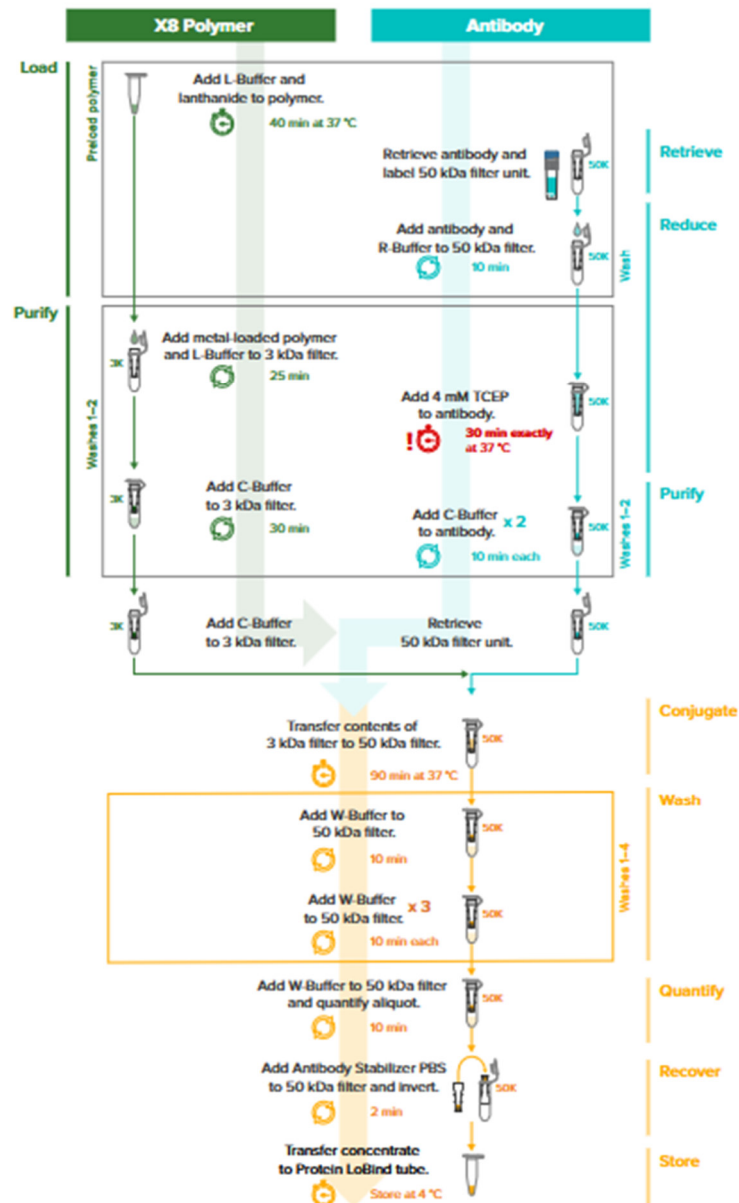


Abb. 5 Übersicht Maxpar X8 Labeling Workflow (aus der offiziellen Anleitung von Standard Biotools ¹⁶⁰)

2.2.2.4. Titration und Validierung sämtlicher Antikörper mittels IMC

Die Antikörper Titration ist in einem IMC Experiment von entscheidender Bedeutung, da eine nachträgliche „Korrektur“ nach Messung nicht mehr möglich ist. Die Signalintensität ist in direkter Beziehung von der Menge der gebundenen Antikörper (bzw. den assoziierten metallischen Markern) abhängig.

Ziel der Titration ist somit die Festlegung des optimalen Signal-Rausch-Verhältnisses für jeden einzelnen Kanal (d.h. jedes einzelne Metall-Antikörper-Paars). So ist die Sensitivität bei zu gering eingesetzter Antikörperkonzentration schlecht. Umgekehrt nimmt die Spezifität bei Überschreiten einer Sättigungsgrenze, durch zunehmend

unspezifische Bindung des Antikörpers im Zielgewebe, ab. Die Titration wurde zeitgleich zur Validierung sämtlicher Antikörper im Herzgewebe verwendet. Aufgrund der hohen Kosten der Experimente und des wertvollen Zielgewebes (Myokard FFPE) wurde sich für eine dreistufige Titration entschieden. d.h. es wurden drei Slides (a-c) gefärbt. Eingesetzt wurden die Antikörper dabei jeweils in folgender Verdünnung: a) 1:50, b) 1:100, c) 1:200. Die finale Antikörperkonzentration wurde anschließend im Mehraugenprinzip nach Durchsicht der Ergebnisse im *mcd-viewer* entschieden. **Abb. 6** zeigt exemplarisch das Ergebnis der Titration von zwei zufällig ausgewählten Markern (145Nd/CD31 und 147Sm/CD163).

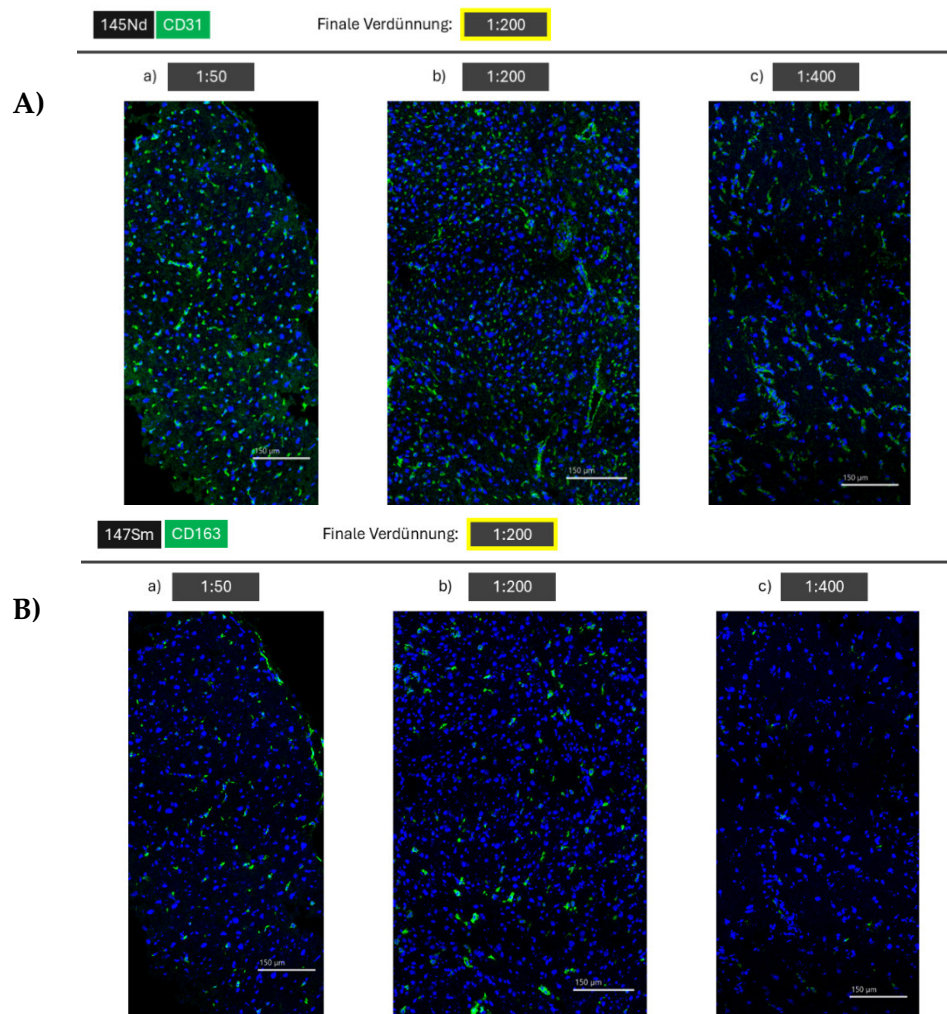


Abb. 6 Beispiel einer Antikörper Titration: Titration von exemplarisch das Ergebnis der Titration von zwei zufällig ausgewählten Markern (145Nd/CD31 und 147Sm/CD163) samt finaler Verdünnung dargestellt a) 1:50, b) 1:200, c) 1:400; A) blau: Nukleus, grün: CD31; B) blau: Nukleus, grün: CD163; Bilder erstellt und exportiert aus *mcd-viewer*

Tabelle 6 IMC Panel: Metalle, Antikörper und eingesetzte Verdünnungen

	Metall	Company	Ordering #	Antigen	Antigen Name	Clone	Company	Ordering #	Verdünnung
	89Y	Sigma Aldrich	204919-10G	TNNT2	Troponin T Type 2 (Cardiac)	1C11	Abcam	ab8295	1:100
	115In	Sigma Aldrich	203440-1G	TPSAB1	Tryptase Alpha/Beta 1	AA1	Biolegend	369402	1:600
	141Pr	SBT/ Fluidigm	S00023	HLA-DR	Major Histocompatibility Complex Class II, DR Beta 1	LN3	Invitrogen	14-9956-82	1:400
▶	142Nd	SBT/ Fluidigm	S00015	FAS	Fas Cell Surface Death Receptor	polyclonal rabbit	Invitrogen	PA5-115214	1:400
	143Nd	SBT/ Fluidigm	S00016	CD34	CD34 Molecule	QBEND/10	Invitrogen	MA5-18091	1:800
	144Nd	*	*	CD14	CD14 Molecule	EPR3653	SBT/ Fluidigm	3144025D	1:200
	145Nd	SBT/ Fluidigm	S00018	PECAM1=CD31	Platelet And Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 = CD31 Molecule	polyclonal goat	R&D	AF3628	1:200
	146Nd	SBT/ Fluidigm	S00019	BCL2L11=BIM	BCL2 Like 11 =Bcl2-interacting mediator of cell death	1C2C8	Invitrogen	MA5-15763	1:200
	147Sm	*	*	CD163	CD163 Scavenger Receptor	EDHu-1	SBT/ Fluidigm	3147021D	1:200
	148Nd	SBT/ Fluidigm	S00021	PDGFRA	Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha	polyclonal goat	R&D	AF307NA	1:200
▶	149Sm	SBT/ Fluidigm	S00022	BCL2L1=BCL-XL	BCL2 Like 1 =B-cell lymphoma-extra large	7B2.5	Novus	NBP1-28559	1:100
	150Nd	SBT/ Fluidigm	S00014	ACTA2= α -SMA	Actin Alpha 2, Smooth Muscle	1A4	Sigma Aldrich	CBL171-I	1:200
	151Eu	SBT/ Fluidigm	S00024	PDGFRB	Platelet Derived Growth Factor Receptor Beta	18A2	Biolegend	323602	1:100
	152Sm	*	*	PTPRC=CD45	Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type C =CD45 Molecule	D9M8I	SBT/ Fluidigm	3152018D	1:200
	153Eu	SBT/ Fluidigm	S00026	MS4A1=CD20	Membrane Spanning 4-Domains A1 =CD20 molecule	H1	BD	555677	1:800
	154Sm	SBT/ Fluidigm	S00027	ZEB1	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1	3G6	Invitrogen	14-9741-82	1:300
	155Gd	SBT/ Fluidigm	S00098	CD86	CD86 Molecule	polyclonal goat	R & D	AF-141-NA	1:400
	156Gd	*	*	CD4	CD4 Molecule	EPR6855	SBT/ Fluidigm	3156033D	1:200
	158Gd	SBT/ Fluidigm	S00029	POSTN	Periostin	polyclonal rabbit	Abcam	ab14041	1:200
	159Tb	SBT/ Fluidigm	S00030	SOX9	SRY-Box Transcription Factor 9	E-9	Santa Cruz	sc-116505X	1:500

	160Gd	SBT/ Fluidigm	S00031	PDPN	Podoplanin	LpMab-21	Biolegend	395002	1:200
	161Dy	SBT/ Fluidigm	S000102	THY1	Thy-1 Cell Surface Antigen	EPR3133	Abcam	ab226123	1:600
	162Dy	*	*	CD8A	CD8A Molecule	C8/144B	SBT/ Fluidigm	3162034D	1:800
	163Dy	SBT/ Fluidigm	S000104	COL1A1	Collagen Type I Alpha 1 Chain	EPR7785	Abcam	ab215969	1:200
	164Dy	SBT/ Fluidigm	S00033	PLIN2	Perilipin 2	polyclonal rabbit	Proteintech	15294-1-AP	1:400
	165Ho	SBT/ Fluidigm	S00034	VWF	Von Willebrand Factor	polyclonal rabbit	Sigma Aldrich	Ab7356	1:400
	166Er	SBT/ Fluidigm	S00035	ADAM12	ADAM Metallopeptidase Domain 12	1G3	Novus	H00008038-M01	1:400
	167Er	*	*	FOXP3	Forkhead Box P3	FJK-16s	SBT/ Fluidigm	91H032167	1:175
►	168Er	*	*	MKI67 =KI67	Marker Of Proliferation Ki-67	B56	SBT/ Fluidigm	3168022D	1:400
	169Tm	SBT/ Fluidigm	S00038	PI16	Peptidase Inhibitor 16	polyclonal goat	R&D	AF4980	1:500
	170Er	*	*	CD3	CD3 Molecule	polyclonal C-Terminal	SBT/ Fluidigm	3170019D	1:400
	171Yb	SBT/ Fluidigm	S00040	S100A4 =FSP1	S100 Calcium Binding Protein A4 = Fibroblast-specific protein 1	1F12-1G7	Novus	N00006275-M01	1:600
	172Yb	SBT/ Fluidigm	S00041	TCF21	Transcription Factor 21	EPR13449	Abcam	ab250578	1:400
►	173Yb	SBT/ Fluidigm	S000106	CDKN2A =P16	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A = p16 protein	2D9A12	Abcam	ab54210	1:400
	174Yb	SBT/ Fluidigm	S00042	FAP	Fibroblast Activation Protein Alpha	polyclonal sheep	R&D	AF3715	1:200
	175Lu	SBT/ Fluidigm	S00043	CD68	CD68 Molecule	KP1	Biolegend	916104	1:800
	176Yb	*	*	Histone 3	Histone 3 = Nukleus	D1H2	SBT/ Fluidigm	4276023D	1:1600
	191Ir /193Ir	*	*	Iridium	Markiert ebenfalls Nukleus		SBT/ Fluidigm	201192A	1:400
	195Pt	*	*	ICSK1	Cell Segmentation Kit 1		SBT/ Fluidigm	Tis-00001	1:800
	196Pt	*	*	ICSK2	Cell Segmentation Kit 2		SBT/ Fluidigm	Tis-00001	1:800

Die mit * markierten Antikörper wurden bereits fertig mit einem Metallisotop konjugiert von Fluidigm/Standard Bio Tools (SBT) käuflich erworben. Die übrigen Antikörper mussten eigenhändig mit Metallisotopen konjugiert werden; (~~Channel~~). Aufgrund schlechter Färbung wurden 167Er/FOXP3 sowie 164dy/PLIN2 aus der Analyse genommen ► markierte Channel (*cell fate* Marker) werden in einem Folgeprojekt analysiert.

2.2.3. IMC „Färbung“ des Zielgewebes

Die FFPE-Myokardbiopsien wurden nach Erhitzen im Trockenofen auf 55°C für 60min in Xylol-Bädern [Carl Roth, Ord# 9713.3] (3x 10min) deparaffinisiert und in den anschließenden Ethanol Bädern [Ethanol ≥99,8 %, Carl Roth, Ord.#1HPH.1] in absteigender Konzentration langsam rehydriert (je 5min Ethanol: 100% - 100% - 90% - 80%). Anschließend wurden die Schnitte für 5 Minuten in ddH₂O und PBS [PBS 10x: Gibco, Ord#: 70011-036] gewaschen. Für das Epitope-Retrieval wurden die Schnitte für 30min in 96°C heißem 1x Tris-EDTA-Tween Puffer im Wasserbad inkubiert. Je zwei Schnitte in einem 50ml Falcon.= [Für 1l Tris-EDTA Puffer (10x): 12,1g Tris base [Merck, Ord#: 10708976001], 3,7g EDTA [Carl Roth, Ord#: 8043.2], pH Anpassung auf pH 9. In den 1x Tris EDTA Puffer wird Tween 20 [Sigma Aldrich, Ord#: P9416-50ML] in einer Konzentration 1:1000 hinzugefügt] Im Anschluss kühlten die Schnitte etwa 20min ab, bevor sie für 10min in PBS gewaschen wurden. Der Antigen-Blocking Schritt erfolgte mit 2% BSA [Carl Roth, Ord#: 8076.3] in PBS für 1h bei Raumtemperatur. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Mix aus Metall-konjugierten Antikörpern (in 2%BSA/PBS) über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Um das Gewebe wurde dazu ein Kreis mit einem PAP Pen [Hölzel Biotech, IHC-SPM0928] gezeichnet. (Für die Materialien und Verdünnungen siehe Tabelle 6). Zur Verhinderung eines *batch-effects* wurden alle verwendeten Schnitte parallel mit demselben Mastermix gefärbt.

Am Folgetag wurden die Schnitte für 5min in PBS mit 0,2% Tween20 gewaschen, gefolgt von 2x 5min in PBS. Im Anschluss erfolgt ein Staining mit einem Iridium Intercalator (siehe Tabelle 6) für 5 Minuten, gefolgt von einem Waschschriff mit PBS (3 x 5min), gefolgt von ddH₂O (5min). Die Schnitte werden unter staubarmen Bedingungen bei Luft getrocknet und anschließend sicher verwahrt bei Raumtemperatur bis zur Messung.

2.2.4. IMC Messung

Die Messung der „gefärbten“ IMC-Schnitte erfolgte an einem Helios™/Hyperion™ *Imaging Mass Cytometer* (Standard BioTools) in der IMC- *core facility* am Universitätsklinikum Erlangen, Medizinische Klinik 3. Es wurden während der Messprozedur die Anweisungen des Herstellers sowie die strengen Vorschriften der *core facility* zum Qualitätsmanagement und zur Dokumentation gewahrt.

Für die Steuerung der Messung wurde die CyTOF Software v7.0.8493 for Imaging Mass Cytometry (Standard BioTools/ Fluidigm) zur Steuerung des IMC-Gerätes verwendet.

Nach jedem Neustart des Gerätes wurde, wie vom Hersteller empfohlen, ein standardisiertes *tuning* Protokoll durchlaufen und das Gerät mittels speziellen „Eich-Objektträger“ (*tuning slide*: Standard Bio Tools, Ord.# #201088) welcher Referenzproben (normierte Konzentration an drei metallischen Markern) enthält, kalibriert. Es wurde streng darauf geachtet, dass sämtliche Betriebsparameter zu jeder Zeit im geforderten Referenzbereich liegen. Durch diesen sorgfältigen Kalibrierungs- und Qualitätskontrollprozess wurde sichergestellt, dass das IMC-Gerät zu jederzeit

vergleichbaren Ergebnissen liefert. Dies war für die Validität der Ergebnisse des vorliegenden Projektes wichtig, da sich -aufgrund der langen Messdauer (c.a. 2-3h pro Objektträger), der Zeitraum der gesamten Messung über einen Zeitraum von mehreren Wochen erstreckte. Der Großteil der Proben für das vorliegende Projekt wurde eigenständig vor Ort gemessen. Die übrigen Messungen wurden freundlicherweise von Dr. Aleix Rius Rigau (Wissenschaftlicher Mitarbeiter Medizinische Klinik3, Universitätsklinikum Erlangen) am selben Gerät durchgeführt.

Im Vorfeld der eigentlichen Messung (sprich der Laserablation mit 200 Hz und einer Auflösung von $1\mu\text{m}^2$) wurden mit dem Hyperion Imaging System jeweils Bilder des Gewebes auf dem jeweiligen Objektträger aufgenommen (sogenannte Panoramas), mithilfe derer manuell die gewünschten *Regions of Interest* (ROIs) eingezeichnet werden konnten. Dabei wurden die Koordinaten rechteckiger Bereiche auf dem Objektträger festgelegt, die anschließend einer Ablation unterzogen werden sollen. (Siehe beispielhaft Abb. 7) Analysiert wurden 64 ROIs von 26 Patienten (7 a-HI, 9 i-HI, 10 SSc-pHI).

Die Rohdaten der IMC Messung wurden als .mcd and .txt -Dateiformat abgespeichert.

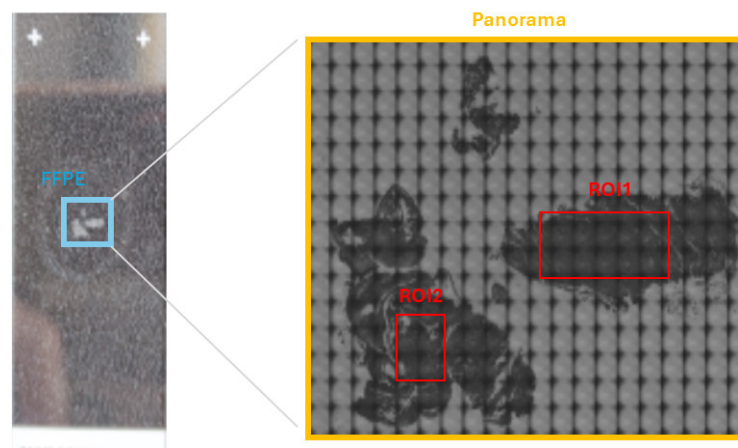


Abb. 7 Beispiel eines Objektträgers während IMC-Messung: ○: FFPE Gewebe auf dem Objektträger. ○: Panorama-Aufnahme (aufgenommen mittels *Hyperion Imaging System*). ○: zwei manuell definierten ROIs.

Abkürzungen: IMC: *engl. imaging mass cytometry*, dt. bildgebende Massenzytometrie; FFPE: *engl. formalin-fixed paraffin-embedded tissue*, dt. Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe; ROI: *engl. region of interest*, dt. definiertes zu abladierendes Areal während IMC Messung

2.2.5. IMC Analyse

2.2.5.1. Hintergrund IMC Analyse

Für die Auswertung hochdimensionaler Datensätze (wie z.B. IMC-Datensatz) bedarf es einer bioinformatischen Analysestrategie. Die im Folgenden dargestellte Analyse der IMC-Daten, basiert weitgehend auf der publizierten Pipeline von *Windhager et al. (2023)*

165

Windhager J, Zanotelli VRT, Schulz D, et al. An end-to-end workflow for multiplexed image processing and analysis. *Nat Protoc.* 2023;18(11):3565-3613. doi:10.1038/s41596-023-00881-0

Sowie der detaillierten Anleitungen der Bodenmiller-Gruppe. „Analysis workflow for IMC data“: <https://bodenmillergroup.github.io/IMCDataAnalysis/index.html>¹⁶¹

Der publizierte Code wurde als Baukasten genutzt und individuell an die spezifischen Anforderungen des eigenen Datensatzes angepasst. Die Reihenfolge der Analyse wurde in bestimmten Bereichen bewusst verändert. Auch wurden bestimmte Abschnitte der Pipeline nicht in der vorgeschlagenen Form durchgeführt bzw. an anderer Stelle durch eigenen Code ergänzt. Abschnitte der Analyse Pipeline wurden zur vereinfachten und standardisierten Datenanalyse und Visualisierung von Dr. Tim Filla in Zusammenarbeit mit Dr. Alexandru Emil Matei und Dr. Yi-Nan Li in Form einer interaktiven Webanwendung (erstellt mittels *shiny framework*) freundlicher Weise zur Verfügung gestellt. Im Rahmen eigener Programmierung mit R wurde ChatGPT 3.5 zur Hilfe hinzugezogen.

Um die Übersichtlichkeit zu wahren, wurde entschieden keinen umfangreichen Code abzdrukken, da die inhaltliche Auseinandersetzung mit den Ergebnissen der Datenanalyse im Zentrum der Arbeit steht. An dieser Stelle wird stattdessen auf den ursprünglichen Code, welcher auf der Github-Seite der Bodenmiller-Gruppe publiziert wurde, verwiesen: <https://github.com/BodenmillerGroup/IMCDataAnalysis>. (zuletzt aufgerufen am 25.10.2024)

Die zentralen Schritte in der durchgeführten Analyse umfassen:

1. Qualitätskontrolle der Rohdaten (mcd-viewer)
2. Präprozessierung der Daten (steinbock framework; Docker basiert)
3. Weiterführende Datenanalyse (R basiert)
 - i. Einzelzellsegmentierung
 - ii. Gating bzw. *supervised annotation*
 - iii. Clustering bzw. *unsupervised annotation*:
 - iv. Visualisierung
 - v. Vergleichende Analyse zwischen verschiedenen Gruppen
 - vi. Räumliche Analyse (*spatial analysis*)

2.2.5.2. Qualitätskontrolle der Rohdaten

Die Rohdaten (.mcd-Dateien) wurden mithilfe von MCD-Viewer V1.0560.6 (Standard Bio Tools) im Mehraugenprinzip überprüft. Bei den Darstellungen im MCD-Viewer handelt es sich um pseudogefärbte Einzel- bzw. Mehrkanalbilder, welche als (16 Bit) .tiff-Dateien exportiert wurden. (Für Beispiele siehe Abb. 8 und Abb. 9)

Neben den Bildern wurde auch das summierte Signal der gewählten Channel (*total ion current*) jeder gemessenen Probe betrachtet, um Ausreißer zu identifizieren.

Aufgrund schlechter „Färbung“, d.h. ungenügendem *signal to noise ratio* wurden folgende Kanäle aus der weiteren Analyse genommen: $^{167}\text{Er}/\text{FOXP3}$ sowie $^{164}\text{Dy}/\text{PLIN2}$.

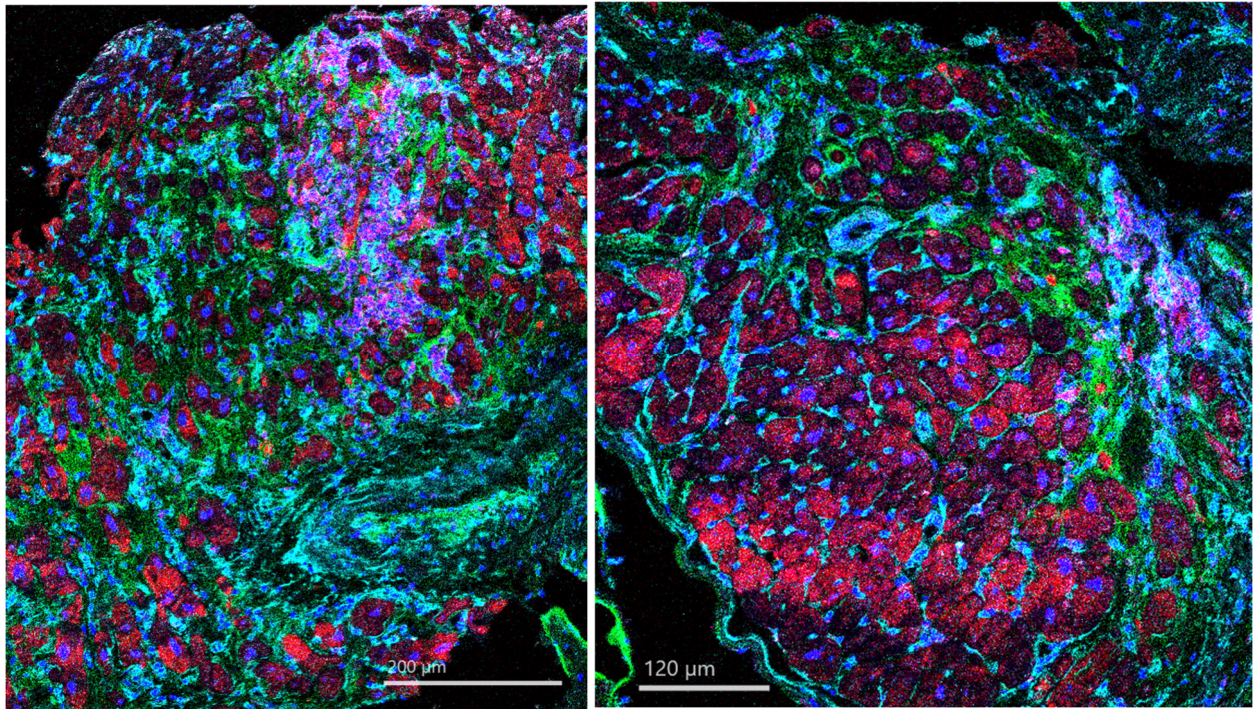
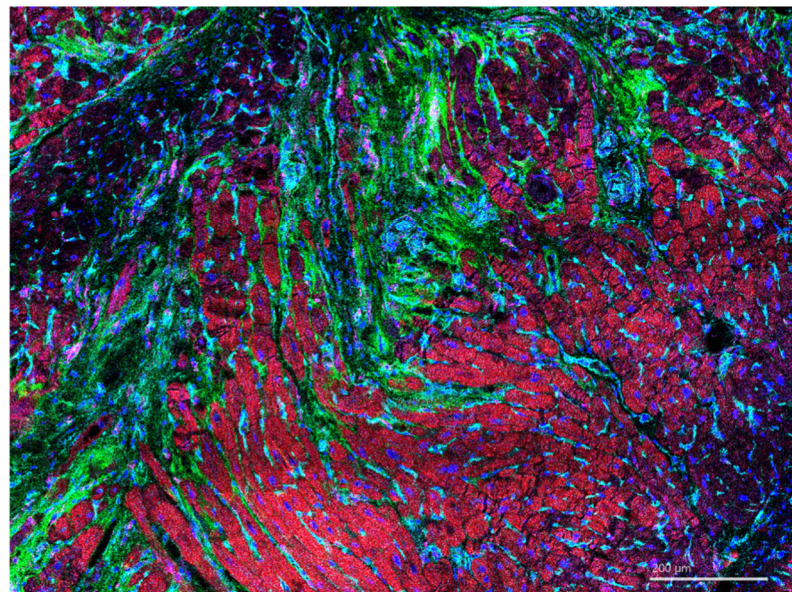
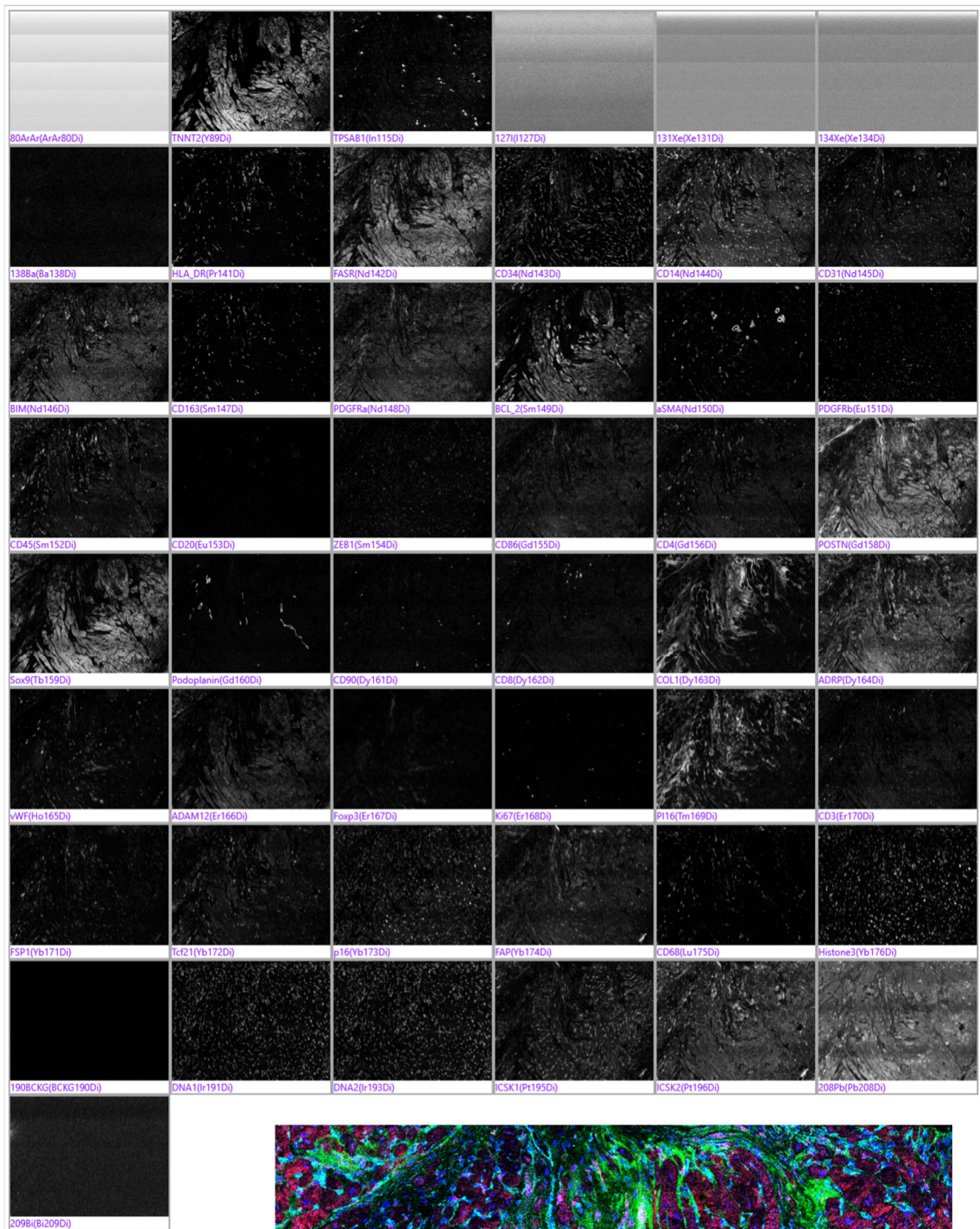


Abb. 8 Zwei zufällig ausgewählte exemplarische ROIs als „pseudo-colorierte“ Mehrkanalbilder

● TNNT2 = Kardiomyozyten, ● DNA = Nuklei, ● CD31 + CD34 = Gefäße, ● COL1A1 = Fibrose, ● CD45 = Immunzellen; ROIs, engl. *regions of interest* (d.h. abladierte Areale)

Abb. 9 (nächste Seite) Darstellung einer exemplarischen ROI mit *thumbnail collage* der Einzelkanälen [oben] und „pseudo-coloriertes“ Mehrkanalbild (Darstellung ausgewählte Kanäle) [unten] Oben: dargestellt sind alle gemessenen Kanäle. Die leeren Kanäle dienen dem Zweck der Qualitätskontrolle der Messung Unten: ● TNNT2 = Kardiomyozyten, ● DNA = Nuklei, ● CD31 + CD34 = Gefäße, ● COL1A1 = Fibrose, ● CD45 = Immunzellen; ROI, engl. *region of interest* (d.h. abladierte Areale)



2.2.5.3. Präprozessierung der IMC-Daten

Um die `.mcd`- und `.txt`-Dateien weiter verarbeiten zu können wurde auf das, ebenfalls von der Bodenmiller-Gruppe publizierte, *steinbock-toolkit* zurückgegriffen. Es wurde die bereitgestellte Docker-Version verwendet.

Die Open-Source-Plattform Docker (Docker Desktop Windows AMD 64, V 4.34.2) ermöglicht es die Anwendungen in komfortablen isolierten portablen Umgebungen (sogenannten *containern*) auszuführen, welche alle notwendigen Abhängigkeiten bereits enthalten, ohne dass sie auf dem individuellen Rechner installiert werden müssen. Hierzu werden statische Vorlagen (sogenannte *images*) definiert aus dessen Angaben heraus ein *container* (quasi als lebendige Instanz des *images*) erstellt werden kann. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass die gewünschte Anwendung stabil und rechnerunabhängig funktioniert.

Es wurde folgendes *image* verwendet: `steinbock:0.16.3-cellpose`

Für Details bzgl. der Anwendung wird auf die entsprechende GitHub-Seite verwiesen:

<https://bodenmillergroup.github.io/steinbock/v0.16.3/> (zuletzt aufgerufen am 05.10.2024)

Die Prozessierung der IMC-Rohdaten erfolgt mittels `readimc` python-Paket.

Folgende Schritte werden der Reihe nach durchgeführt:

1. Datenimport von `.mcd` und `.tiff`-Dateien in das *steinbock*-System
2. (halb)automatische Generierung einer `panel.csv`-Datei: erstellt wurde dabei eine `.xls`-Datei mit folgenden Spalten :

channel	name	keep	ilastik	deepcell
---------	------	------	---------	----------

Diese Tabelle wurde manuell angepasst wie folgt:

- Die im *panel* verwendeten Kanäle (*=channel*) wurden mit `keep = 1` ausgewählt (leere Channel entsprechend mit `keep = 0` abgewählt)
- Ilastik wurde ignoriert
- Für die folgende automatische Segmentierung von Einzelzellen mittels *deepcell* Algorithmus wurden mit `deepcell = 1` die gewünschten nukleären Marker und mit `deepcell = 2` die gewünschten zytoplasmatischen bzw. zellmembranständigen Marker ausgewählt.

Folgende Liste (Tabelle 7) gibt die ausgewählten Parameter wieder:

Tabelle 7 **Ausgewählte Parameter in *steinbock* für die folgende Einzelzellsegmentation**

channel	name	keep	ilastik	deepcell
ArAr80	80ArAr	0	1	
Y89	TNNT2	1	2	2
In115	TPSAB1	1	3	
I127	127I	0	4	
Xe131	131Xe	0	5	
Xe134	134Xe	0	6	
Ba138	138Ba	0	7	
Pr141	HLA_DR	1	8	
Nd142	FASR	1	9	
Nd143	CD34	1	10	
Nd144	CD14	1	11	
Nd145	CD31	1	12	2
Nd146	BIM	1	13	
Sm147	CD163	1	14	
Nd148	PDGFRa	1	15	2
Sm149	BCL_2	1	16	
Nd150	α -SMA	1	17	2
Eu151	PDGFRb	1	18	2
Sm152	CD45	1	19	2
Eu153	CD20	1	20	
Sm154	ZEB1	1	21	
Gd155	CD86	1	22	
Gd156	CD4	1	23	
Gd158	POSTN	1	24	
Tb159	Sox9	1	25	
Gd160	Podoplanin	1	26	
Dy161	CD90	1	27	
Dy162	CD8	1	28	
Dy163	COL1	1	29	
Dy164	ADRP	1	30	
Ho165	vWF	1	31	
Er166	ADAM12	1	32	
Er167	Foxp3	1	33	
Er168	Ki67	1	34	
Tm169	PI16	1	35	
Er170	CD3	1	36	
Yb171	FSP1	1	37	
Yb172	Tcf21	1	38	
Yb173	p16	1	39	
Yb174	FAP	1	40	
Lu175	CD68	1	41	2
Yb176	Histone3	1	42	1
BCKG190	190BCKG	0	43	
Ir191	DNA1	1	44	1
Ir193	DNA2	1	45	1
Pt195	ICSK1	1	46	2
Pt196	ICSK2	1	47	2
Pb208	208Pb	0	48	
Bi209	209Bi	0	49	

3. Bildvorverarbeitung mit Hot-Pixel-Entfernung:

Die *.mcd/.txt*-Dateien werden zu *.tiff*-Dateien konvertiert. Die Bildqualität wurde während des Konversionsprozesses durch Entfernung von Artefakten, sogenannten

„Hot Pixels“, verbessert. *Hot Pixels* sind Bildpunkte, die aufgrund von technischen Problemen signifikant hellere oder dunklere Werte aufweisen als die umgebenden Pixel.

4. Mehrkanal Einzelzellsegmentierung (*single-cell segmentation*) mittels Mesmer/DeepCell:

Steinbock“ ermöglicht unterschiedliche Arten der Einzelzellsegmentation, sowohl mittels Pixel-Klassifikation -als auch *Deep-Learning* basierte Ansätze.

Die Einzelzellsegmentierung ist ein entscheidender Schritt für die weitere Analyse der IMC-Daten. Eine etablierte Methode zur Einzelzell-Segmentierung myokardialer IMC Daten existiert bis dato nicht. Die automatisierte Einzelzell-Segmentierung von myokardialem Gewebe birgt einige Herausforderungen. Es wurden verschiedene, von Steinbock unterstützte Strategien versucht u.a. Verfahren des interaktiven maschinellen Lernens mit Methoden der Pixelklassifikation (Ilastik V 1.3.3/ CellProfiler V 4.2.5)¹⁶⁶ sowie *Deep-Learning Tools* zur Einzelzellsegmentierung z.B. „CellPose/cyto2-Modell“ bzw. „CellPose/nuclei-Modell“.¹⁶⁷

Für die finale Analyse wurde schließlich der ebenfalls in Steinbock integrierte „DeepCell/Mesmer Algorithmus“ verwendet.¹⁶⁸

Basierend auf den zuvor manuell definierten Kategorien „zytoplasmatisch/zellmembranständig“ und „nukleär“ erfolgt im Python-basierten *Open-Source-Framework* DeepCell mithilfe des *Deep-Learning*-Segmentationsalgorithmus Mesmer die automatische Generierung von Zellsegmentationsmasken. Mesmer wurde mit annotierten Bilddaten aus der Datenbank TissueNet trainiert und segmentiert Zellkerne sowie vollständige Zellgrenzen präzise. Die Masken werden als *.tiff*-Datei abgespeichert. (siehe exemplarisch **Abb. 10**) Die Segmentation der Kardiomyozyten-Zytoplasma ist mit dem gewählten Ansatz zwar nicht optimal, allerdings werden kleinere Zellen zwischen den Kardiomyozyten (auf welche im folgenden Projekt der Hauptfokus gelegt wurde) mit hoher Sensitivität erfasst. Es wurden verschiedene durchdachte Kombinationen von nukleären und zytoplasmatischen bzw. zellmembranständigen Markern getestet, um die automatische Segmentierung mit DeepCell/Mesmer zu optimieren. Dabei zeigte sich ein äußerst konsistentes Ergebnis in Bezug auf die generierten Zellmasken, was die Zuverlässigkeit und Präzision der Methode unterstreicht. Zur Erleichterung der weiteren Datenanalyse und Verbesserung der allgemeinen Vergleichbarkeit und damit auch Genauigkeit des Segmentierungsprozesses wurde eine Min-Max Normalisierung durchgeführt, d.h. es für jedes Bild und jeden Kanal wurde der kleinste (Min) und größte (Max) Intensitätswert ermittelt. Durch eine mathematische Transformation wird erreicht, dass alle Werte zwischen 0 und 1 liegen.

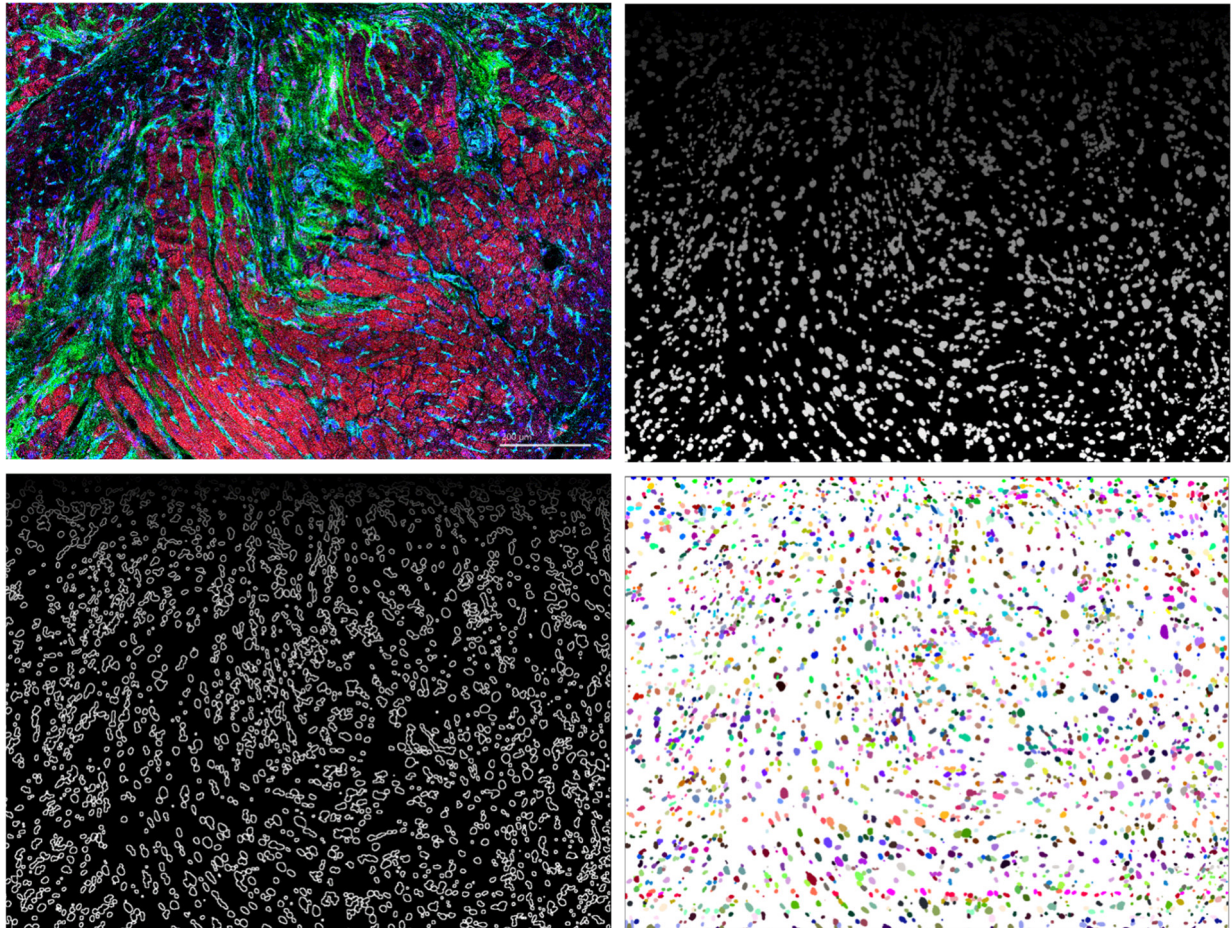


Abb. 10 Darstellung einer exemplarischen ROI mit „pseudo-coloriertem“ Mehrkanalbild (Darstellung ausgewählter Kanäle) [oben links] und Darstellung der Einzelzellsegmentationsmaske (verschiedene Darstellungen) [Original tiff oben rechts und Bearbeitung mittels ImageJ unten]

Oben links: MCD-viewer; ●: TNNT2 = Kardiomyozyten, ●: DNA = Nuklei, ●: CD31 + CD34 = Gefäße, ●: COL1A1 = Fibrose, ●: CD45 = Immunzellen

Oben rechts: Original .tiff-Einzelzellsegmentationsmaske ; Unten: verschiedene Darstellungen, bearbeitet mittels ImageJ. ROI, engl. region of interest (d.h. abladierte Areale)

5. Extraktion der Signalintensitäten auf Einzelzellebene:

Da in der Regel mehrere Pixel innerhalb der Zellmaske für eine einzelne Zelle liegen, wurden die Intensitäten der Pixel die zu einer bestimmten Zelle gehören für jeden Kanal getrennt gemittelt. Auf diese Weise werden repräsentativere Intensitätswerte pro Zelle definiert. Durch die Verwendung von Mittelwerten wird das Rauschen zudem automatisch reduziert.

6. Quantifizierung morphologischer Eigenschaften auf Einzelzellebene:

Für weiterführende Analysen, insbesondere spätere Analysen räumlicher Beziehungen von Einzelzellen im Gewebe sind morphologische Informationen zu jeder einzelnen Zelle (z.B. *area*, *centroid*, *major_axis_length*, *minor_axis_length*, *eccentricity*) hilfreich. Steinbock ist in der Lage für jede segmentierte Zelle morphologische und räumliche Eigenschaften, ebenso wie relevante bildspezifische Metadaten (z.B. Bildmaße) automatisch zu extrahieren.

7. Datenexport

Bilder (inklusive der generierten Einzelzellsegmentationsmasken) wurden als `.ome-tiff`-Dateien und Einzelzelldaten (insbesondere extrahierte Signalintensitäten, Daten zur Zellmorphologie und räumliche Informationen) als `.csv` Tabellen extrahiert. Diese Dateien bilden die Grundlage für die weitere Analyse.

2.2.5.4. Weiterführende (R basierte) Datenanalyse

2.2.5.4.1. Technische Details

Nach der Präprozessierung folgt die weitere Datenanalyse prinzipiell dem von der Bodenmiller Gruppe publizierten, R basierten, Workflow für die Analyse von IMC Daten.

Verwendet wurde R version 4.3.2 2023-10-31 ucrt und R Studio Desktop Version 2024.9.0.375'.

```
git clone https://github.com/BodenmillerGroup/IMCDataAnalysis.git
```

In R wurden folgende Pakete installiert:

```
listOfPackages <- c(
  "tidyverse", "shiny", "BiocManager", "devtools", "i-cyto/Rphenograph",
  "SpatialExperiment", "imcRtools", "cytomapper", "stringr", "HDF5Array",
  "BiocParallel", "dplyr", "ggplot2", "BodenmillerGroup/cytoviewer", "dittoSeq",
  "viridis", "JinmiaoChenLab/Rphenograph", "mclust", "scater", "patchwork",
  "cowplot", "Matrix", "umap", "tsne", "irlba", "CATALYST", "igraph", "caret",
  "batchelor", "ggrepel", "EBImage", "scuttle", "MASS", "Matrix",
  "RColorBrewer", "SingleCellExperiment", "ggribes", "ComplexHeatmap",
  "magick", "statmod", "openxlsx", "lisaClust", "corrplot", "readxl",
  "rstatix", "ggpubr", "ggsci", "tibble", "scales", "nlme", "gridExtra", "edgeR",
  "sva", "pHeatmap", "circlize", "clusterProfiler", "DT", "shinydashboard",
  "pander", "ReactomePA", "reactome.db", "enrichplot", "glmnet", "caTools",
  "pROC", "ROCR", "clue", "webshot", "colorRamp2", "kableExtra", "knitr",
  "ggradar" statmod", "openxlsx", "readxl")
```

2.2.5.4.2. Laden der Daten in R und Umformatierung:

Es wurden das *spe* (*spatial experiment*) Objekt (.rds-Datei) sowie *images* und *cell masks*, wie im Präprozessierungsschritt generiert, in die R Umgebung geladen.

Das *spe* ist eine S4-Klasse in R/Bioconductor, die für die Speicherung von Daten aus räumlichen *Omics*-Experimenten entwickelt wurde (als Erweiterung der *Single Cell Experiment* (SCE) S4 Klasse). Für das Verständnis der Analyse hilft es über ein grundsätzliches Verständnis von der Struktur eines *spe* Objektes zu verfügen. Für eine Übersicht siehe **Abb. 11** sowie für weitere Details: <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/vignettes/SpatialExperiment/inst/doc/SpatialExperiment.html> (zuletzt besucht am 05.10.2024)

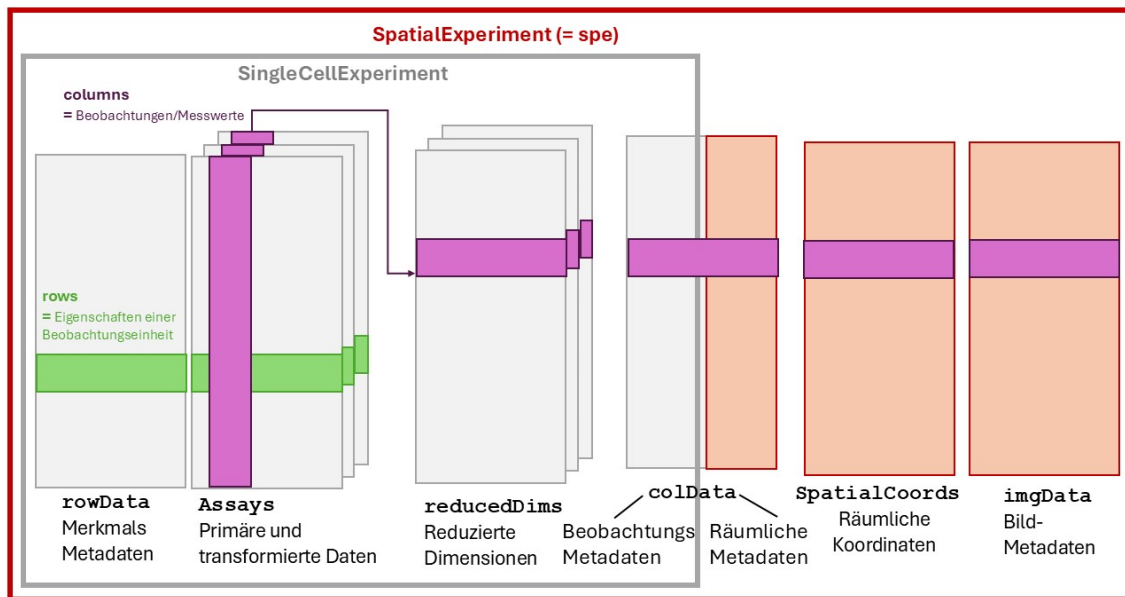


Abb. 11 Übersicht Struktur eines *spatial element object (spe)* in R; erstellt nach Vorbild von: <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/vignettes/SpatialExperiment/inst/doc/SpatialExperiment.html> (zuletzt besucht am 05.10.2024)

2.2.5.4.3. Anwendung eines Größenfilters auf die Einzelzellmaske

Aus der existenten Zellmaske wurden mittels Filter (Einstellung: 30-500) Artefakte, welche keine wirklichen Zellen darstellen, gefiltert. Die Filtereinstellungen wurden durch Kontrolle im Bild überprüft. (Siehe hierzu **Abb. 12**)

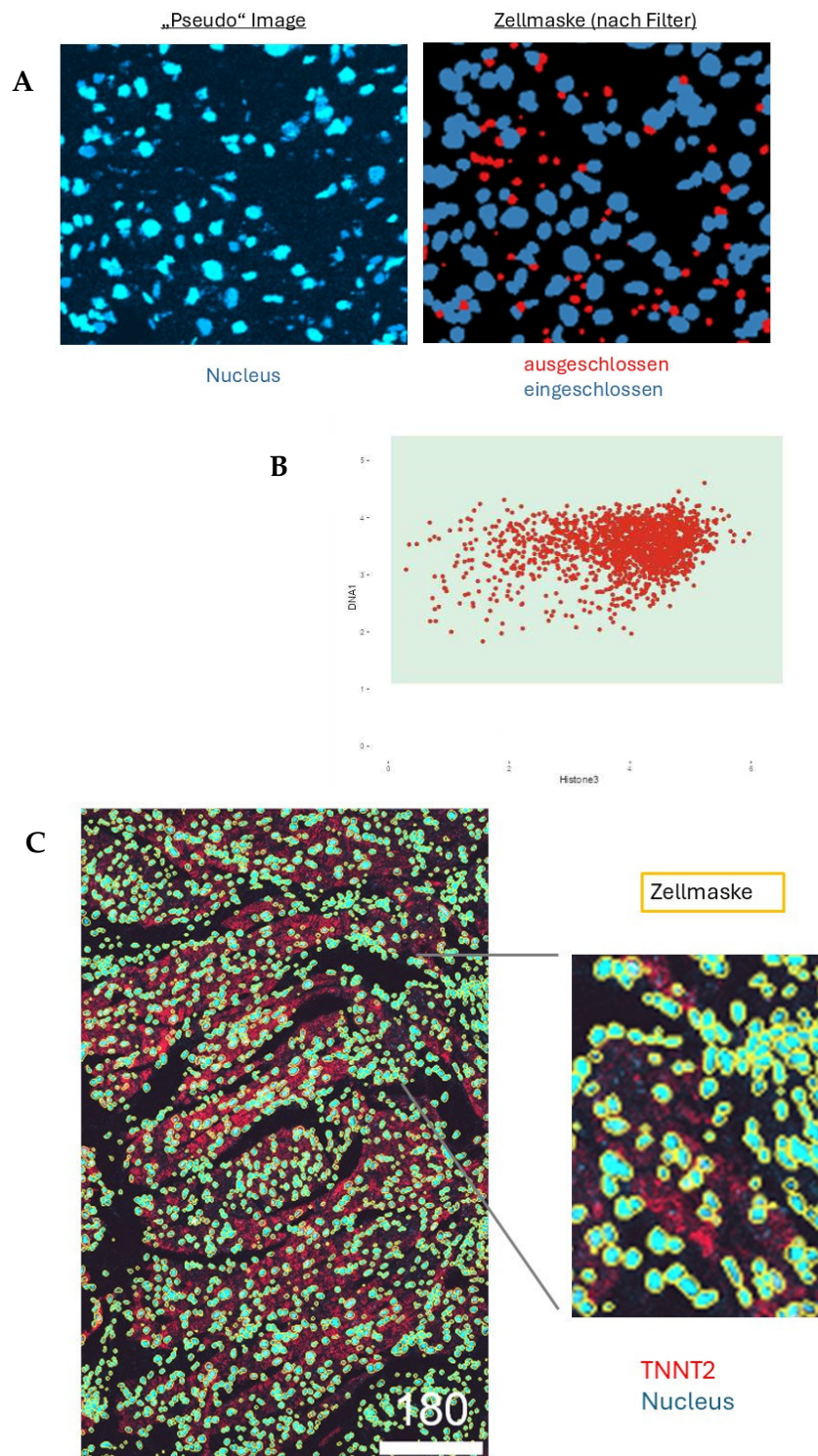


Abb. 12 Darstellung nach Anwendung des Größenfilters auf die Einzelzellmaske, **A)** Bsp. Zellmaske eingeschlossene und ausgeschlossene Objekte, **B)** Bsp. Scatter Plot DNA1 und Histone 3: Nachweis eines nukleären Signals in allen eingeschlossenen Objekten **C)** Bsp. Darstellung der finalen Zellmaske (○) als Overlay über ein Pseudoimage (●TNNT2, ●Nukleus)

2.2.5.4.4. Transformation und Quantil-Normalisierung der Daten

Für die weitere Datenanalyse wurden die (nicht normalisierten) Daten (*counts*) transformiert mit folgenden Verfahren:

1. Asinh-Transformation (*asinh*), d.h. Transformation der nicht-normalisierten Daten mittels inverser hyperbolischer Sinusfunktion,

$$\text{asinh}(x) = \frac{\ln(b \cdot x + \sqrt{(b \cdot x)^2 + 1})}{a}$$

(Cofaktoren = 1)

2. Min Max *rescaling* (rescaled) der *asinh* transformierten Daten *per row*, Werte: [0, 1]
3. z- *rescaling* (z-rescaled) der *asinh* transformierten Daten *per row*, Werte: [0, 1]

$$\text{rescaled} = \frac{x - \min(x)}{\max(x) - \min(x)}$$
$$\text{z-rescaled} = \frac{x - \text{mean}(x)}{\text{sd}(x)}$$

4. Quantil-Normalisierung (*quantnorm*): basierend auf code von Dr. Yi-Nan Li; Ziel ist die Normalisierung der Daten *per sample* basierend auf den Quantilen (default = 0.95), Werte: [0, 1]

```
> assays(spe)
List of length 4
names(4): counts asinh rescaled z-rescaled quantnorm
```

2.2.5.4.5 Gating bzw. supervised annotation

Die Entwicklung einer geeigneten Gating-Strategie für die vorliegenden Daten erwies sich als herausfordernd. Aufgrund des ubiquitären *cardiac Troponin 2* (TNNT2)-Signals war ein Gating auf TNNT2-negative Zellen, wie es theoretisch sinnvoll gewesen wäre, nicht möglich, da dies zu einem erheblichen Verlust von Nicht-Kardiomyozyten geführt hätte.

Aus diesem Grund entschieden wir uns für folgende *Gating*-Strategie:

1. Zunächst wurde auf alle „echten“ Zellen, d.h. segmentierte Objekte, welche sich positiv für nukleäre Marker Histon 3 bzw. DNA1/DNA2 (=Iridium) darstellten, gated. Aufgrund der vorrangegangenen Selektion mittels Größenfilters entsprachen > 99,9% der Zellen in der finalen Zellmaske bereits tatsächlichen Zellen (mit klarem nukleärem Signal).
2. Aufgrund der klaren Expression und guten „Färbung“ wurde im Anschluss auf CD45+ (Immunzellen) und CD45- (Nicht Immunzellen, respektive Kardiomyozyten und sonstige Zellen inklusive vaskulären Zellen und Stromazellen) gated.

Das manuelle Gating erfolgte mithilfe der von der Bodenmiller-Gruppe u.a. zu diesem Zweck entwickelten cytomapper shiny Anwendung. Das rechteckige Gate kann hierbei im *Scatterblot* manuell gewählt werden; Parallel erlaubt die Anwendung die Kontrolle der Markerexpression im ausgewählten Gate (Für ein Bsp. siehe Abb. 13)

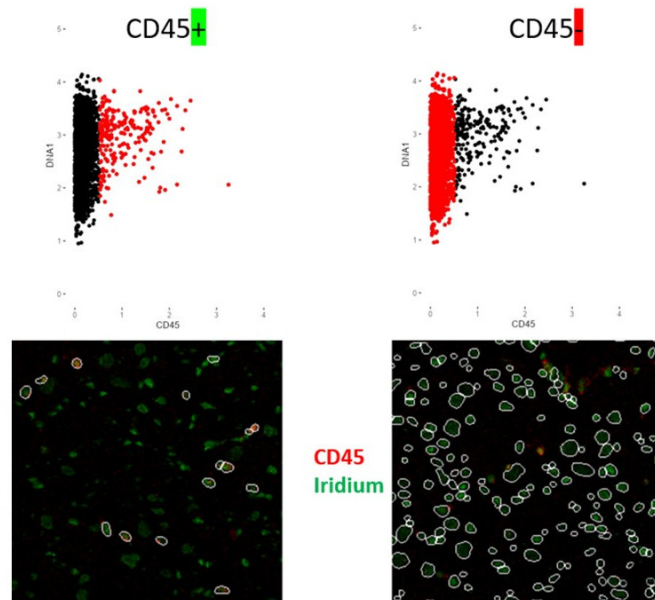


Abb. 13 Beispiel für Gating in cytomapper shiny Anwendung: oben Scatterplots mit CD45+ gate (links), CD45- gate (rechts), darunter die entsprechende Kontrolle im Bild: ● : CD45, ● : Iridium (Nukleus), Zellmaske (○)

Es wurden lediglich 12 zufällig ausgewählte ROIs (von insgesamt 64 ROIs) manuell gated und mit Labeln („leukocytes“ oder „other“) versehen (4x a-HI, 4x i-HI, 4x SSc-pHI). Diese manuell gelabelten ROIs wurden im folgenden Schritt als Trainingsdaten für einen automatischen *random forest* Klassifizierungsalgorithmus verwendet, welcher die Annotation in (CD45+ und CD45- Zellen) für die übrigen ROIs durchführte. Für den random forest classifier wurden quantilnormalisierte (quantnorm) Daten verwendet.

Ein *Random Forest Classifier* ist ein maschinelles Lernmodell. Mithilfe zufälliger Teilmengen der Trainingsdaten werden eine Reihe von Entscheidungsbäumen erstellt, wobei für jeden Baum eine zufällige Auswahl an Eigenschaften bestimmt wird, auf deren Basis die Entscheidung gefällt werden soll. Durch iteratives Training wird der Entscheidungsprozess (CD45+/CD45-) schrittweise optimiert. Werden nun neue Testdaten (ROIs mit ungelabelten Zellen) in den „Random Forest“ geworfen, so durchlaufen die Zellen alle die Entscheidungsbäume. Das Mehrheitsvotum wird als endgültiges Ergebnis festgelegt.

Im finalen Gating wurden von insgesamt 82673 Zellen 6444 CD45+ Immunzellen (7,8%) und 76229 CD45- Nicht-Immunzellen (92,2%) definiert (Siehe Abb. 14)

```
> total_cells <- ncol(spe)
```

```
> print(total_cells)
[1] 82673
```

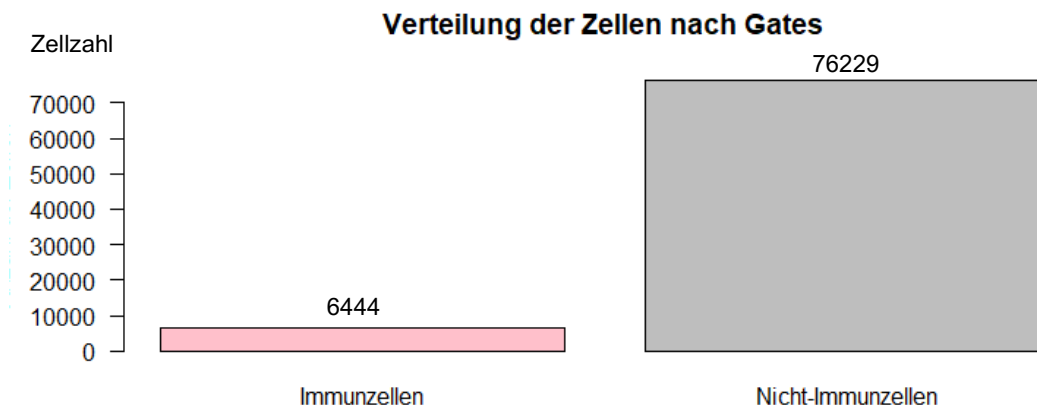


Abb. 14 Verteilung der Zellen nach Gates

Die Gesamtzellzahl verteilt sich auf die Krankheitsentitäten wie folgt: SSc-pHI 35706 Zellen, a-HI 20551 Zellen und i-HI 26416 Zellen.

2.2.5.4.6 Dimensionsreduktion

Für die Visualisierung der hochdimensionalen Daten wurde eine Dimensionsreduktion durchgeführt und die Zellen im CD45+ und CD45- gate wurden mittels *uniform manifold approximation and projection* (UMAP) sowie *t-distributed stochastic neighbor embedding* (t-SNE) in zwei Dimensionen dargestellt.

Im direkten Vergleich scheint die UMAP Reduktion die globale Struktur der Daten etwas besser zu erhalten, bei zufriedenstellender lokaler Auflösung.

2.2.5.4.7 Clustering bzw. *unsupervised annotation*

Die weitere Annotation der Zellen sollte anhand der Marker unüberwacht, d.h. ohne menschliches Eingreifen in den Prozess der Gruppierung der Zellen, erfolgen. Dieser Teil der Analyse erfolgte in der von Dr. Tim Filla freundlicher Weise zu Verfügung gestellten interaktiven, shiny basierten, Webanwendung. (Der Code ist im Detail geistiges Eigentum von Dr. Tim Filla und kann daher nicht an dieser Stelle zitiert werden. Im Wesentlichen basiert er auf der publizierten Pipeline von *Windhager et al.*2023.)

Es wurden mehrere etablierte Clustering Ansätze, darunter RPhenograph, FlowSom und GausMix, angewendet und die Ergebnisse im Rahmen einer kritischen Mehraugenbewertung evaluiert. Hierbei kamen unterschiedliche Marker-Kombinationen sowie verschiedene Parameter wie z.B. unterschiedliche k-Werte sowie unterschiedlich transformierte Daten (*assays*) zum Einsatz.

Wir entschieden uns für den RPhenograph Algorithmus, einer Clustering-Methode, welcher auf einem k-nearest-neighbour Graphen basiert. Vor dem unsupervised Clustering wurde der Datenraum durch Festlegung einer sinnvollen Markerkombination sowie ein k Wert (=Anzahl der Nachbarn) festgelegt.

Wir entschieden uns schließlich für das Clustering mit folgenden Parametern:

- CD45+ gate: Rphenograph Clustering, k = 55, rescaled transformierte Daten, Marker: TPSAB1, HLADR, CD34, CD14, CD163, CD20, CD86, CD4, CD8, CD3, CD68
- CD45- gate: Rphenograph Clustering, k = 40, rescaled transformierte Daten, Marker: TNNT2, CD34, CD31, PDGFRA, ASMA, PDGFRB, ZEB1, POSTN, SOX9, PDPN, THY1, COL1A1, VWF, ADAM12, PI16, FSP1, TCF21, FAP

Die meisten Grafiken zur weiteren Charakterisierung der Cluster wurden ebenfalls aus der Webanwendung heraus erstellt.

Abb. 15 gibt für einen zusammenfassenden Überblick über die durchgeführte Annotation der Zellen.

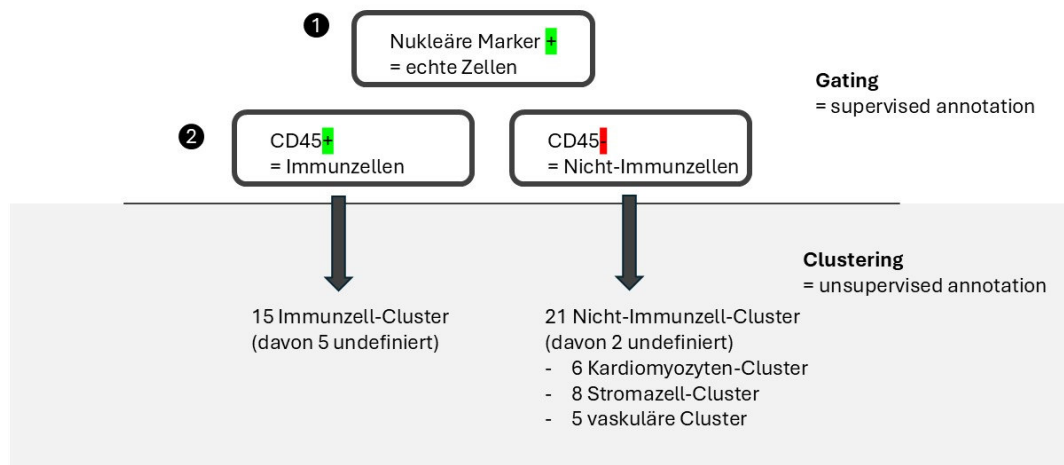


Abb. 15 Überblick über die *supervised* und *unsupervised* Annotation der Zellen

2.3 Verfassung der Dissertationsschrift und Erstellung von Abbildungen

Die Dissertation wurde mithilfe des Textverarbeitungsprogramms Microsoft Word (Microsoft 365 MSO, Word Version 2409 Build 16.0.18025.20030 64 Bit) verfasst.

Die Abbildungen wurden mit Microsoft PowerPoint (Microsoft 365 MSO, PowerPoint Version 2409 Build 16.0.18025.20030 64Bit) sowie der BioRender Software erstellt. Eine Lizenz für die Veröffentlichung der mit BioRender erstellten Grafiken ist vorhanden.

Die Grafiken im Ergebnisteil wurden darüber hinaus größtenteils mittels R direkt aus der Analyse-Pipeline heraus erstellt (R version 4.3.2 2023-10-31 ucrt und R Studio Desktop Version 2024.9.0.375'). Bunte Mehrkanalbilder der Rohdaten (.mcd-Dateien) wurden aus MCD-Viewer V1.0560.6 (Standard Bio Tools) heraus exportiert. Für die Betrachtung und Bearbeitung von .tiff-Dateien wurde ImageJ (<https://fiji.sc>) verwendet.

Der Text wurde selbstständig verfasst und von Herrn PD Dr. med. Wolfgang Merkt, Frau Dr. med. Hermina Györfi sowie Herrn Prof. Jörg H. W. Distler gegengelesen.

Eine Veröffentlichung der Daten in einem *peer-reviewed journal* ist vorgesehen. Die Daten wurden als Abstract eingereicht zur Präsentation auf dem EULAR Kongress 2025 sowie auf dem Symposium der Medical Research School 2025 (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf).

Die Literaturrecherche erfolgte über PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). Im Verlauf des Schreibprozesses wurde ChatGPT-3.5 genutzt, um präzisere Formulierungen zu finden und technische Details der Analyse besser verständlich zu erklären. Alle Informationen, die durch die generative Künstliche Intelligenz bereitgestellt wurden, unterlagen einer sorgfältigen und kritischen Prüfung, um deren Richtigkeit und Relevanz zu gewährleisten.

Es wurde das Literaturverwaltungsprogramm Citavi 6.19 verwendet für Organisation der verwendeten Literatur und das Einfügen von Referenzen.

3. Ergebnisteil

3.1. Hypothese und Idee des Projektes

Die SSc-pHI gehört zu den zentralen Organkomplikationen der SSc und trägt maßgeblich zur krankheitsassoziierten Sterblichkeit bei. Klinisch und wissenschaftlich ist die spezifische Pathogenese der SSc-pHI bislang unzureichend untersucht und verstanden. Im Vergleich zu anderen entzündlichen Erkrankungen des Myokards z.B. Herzbeteiligung im Rahmen anderer Autoimmunerkrankungen (a-HI) oder idiopathischer Myokarditis (i-HI) ist die SSc-pHI klinisch mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Histologische Untersuchungen haben in der SSc-pHI eine ausgeprägtere Fibrosereaktion festgestellt, für die derzeit noch keine Erklärung vorliegt. Es wird jedoch vermutet, dass die aggressiv verlaufende Myokardfibrosierung einen entscheidenden Einfluss auf das schlechtere klinische Outcome der SSc-pHI hat.¹³³

Das Myokard weist im Vergleich zu anderen Geweben ein stark eingeschränktes Regenerationspotenzial auf. Bei einem schweren akuten oder chronischen Schaden kommt es im Rahmen der Defektheilung zu einem pathologischen *Remodeling* mit Induktion von myokardialer Fibrose. Diese Fibrosereaktion stellt eine maladaptive Antwort des Herzgewebes dar und beeinträchtigt langfristig die strukturelle und funktionelle Integrität des Herzens. Die myokardiale Fibrose, als Endstrecke verschiedenster schwerer Herzerkrankung, stellt aufgrund des Fehlens einer wirksamen Therapie, eines der drängendsten ungelösten Probleme der modernen Kardiologie dar. Die Studie der SSc-pHI, als prototypisch fibrosierende myokardiale Erkrankung, bietet eine einzigartige Gelegenheit, grundsätzliche Mechanismen der myokardialen Fibrosebildung besser zu verstehen und kann dabei helfen neue therapeutische Zielstrukturen zu identifizieren.

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, besteht ein erheblicher Mangel an umfassender Phänotypisierung der Zellpopulationen im Myokard bei SSc-pHI sowie anderen entzündlich-fibrosierenden Herzerkrankungen.

Neue Omics-Methoden, wie beispielsweise die IMC bieten die Möglichkeit, die zelluläre Zusammensetzung von Geweben in bisher ungeahnter Tiefe und mit räumlicher Dimension zu untersuchen. Dies eröffnet neue Chancen, insbesondere auch für die Analyse seltener Erkrankungen (mit limitiertem Biomaterial).

Die Intention des dargestellten Projektes war die erstmalige, tiefergehende explorative Analyse der Stroma- und Immunzellsubpopulationen in der SSc-pHI, im direkten Vergleich zu a-HI und i-HI, mittels IMC. Ein weiteres Ziel unserer Arbeit war die Charakterisierung von Gewebsnischen sowie derer zellulären Netzwerke.

Wir stellten die Hypothese auf, dass bei SSc-pHI, a-HI und i-HI sowohl gemeinsame als auch unterschiedliche Zell(sub)populationen und Gewebenischen existieren, die mittels IMC charakterisiert werden könnten.

Mithilfe eines, eigens für dieses Projekt entwickelten IMC-panels wurden EMBs von 10 Patienten mit SSc-pHI, 7 Patienten mit a-HI und 9 Patienten mit i-HI analysiert. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Analyse präsentiert, bevor im abschließenden Kapitel eine kritische Diskussion der Resultate erfolgt.

3.2. Zellcluster

3.2.1. CD45+ Immunzell-Cluster

Etablierte Methoden, wie konventionelle Immunfluoreszenz oder Multiplex-Immunhistochemische-Färbungen, ermöglichen für gewöhnlich die gleichzeitige Untersuchung von maximal 4 bis 6 Markern. Im Vergleich dazu ermöglicht das im vorliegenden Projekt verwendete IMC-Panel, die gleichzeitige Analyse von 12 (funktionierenden) Immunzellmarker (inklusive CD45).

Hiermit konnten durch *unsupervised* Clustering 15 distinkte Immunzell-Cluster identifiziert werden. Abb. 16 zeigt die identifizierten Cluster in einer Darstellung in reduzierter Dimension (*Uniform Manifold Approximation and Projection*, UMAP)

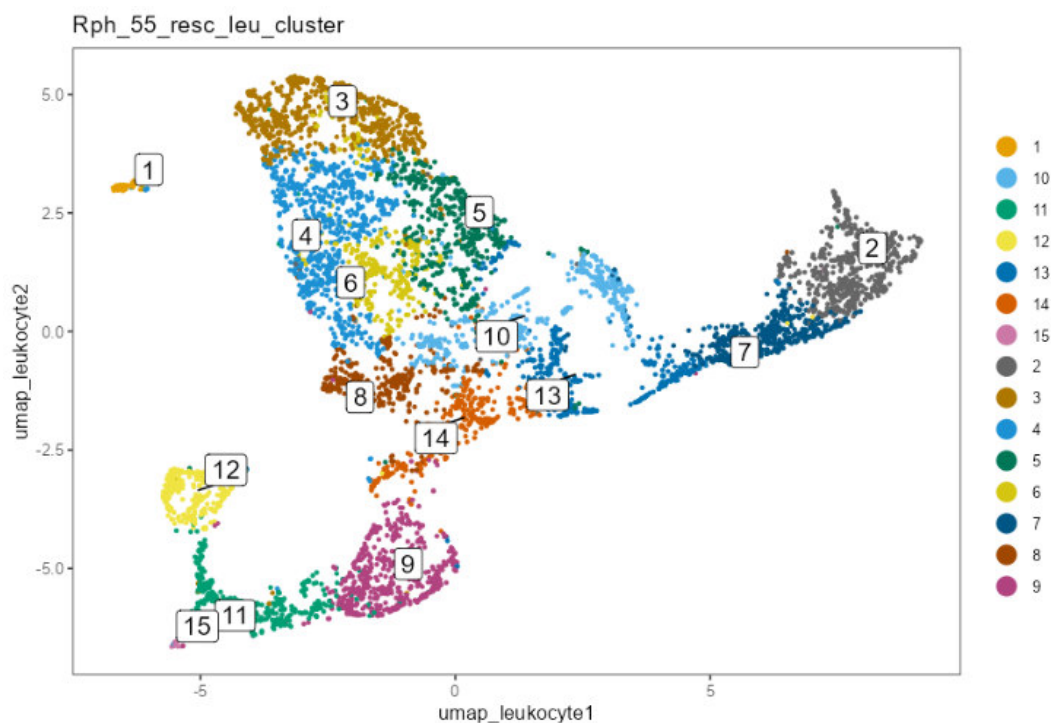


Abb. 16(CD45+) Immunzell-Cluster: Darstellung in reduzierten Dimensionen: A) UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) Das Clustering erfolgte mittels RPhenograph Algorithmus mit $k = 55$ und *rescaled* Datensatz. In der Legende farblich codiert und im Plot nummeriert sind jeweils die 15 identifizierten Immunzell (=Leukozyten) cluster.

Im folgenden Schritt wurden die identifizierten Immunzell-Cluster näher charakterisiert. **Abb. 17** zeigt zwei Varianten *Heatmaps* in welchen die Expression der Immunzell-Marker in den identifizierten Clustern dargestellt wird. Auf diese Weise wird es möglich den biologischen Hintergrund der Cluster zu entschlüsseln. In **Tabelle 8** werden die Immunzell-Cluster samt Cluster-definierender Marker und der biologischen Interpretation („Clusterbezeichnung“) aufgelistet.

Von den 15 identifizierten Immunzell-Clustern blieben fünf undefiniert, d.h. die CD45⁺ Zellen in diesen Clustern, wurden von keinem der im Panel inkludierten Markern charakterisiert. Da wichtige Immunzellpopulationen wie z.B. Granulozyten, NK-Zellen oder dendritische Zellen durch die vorhandenen Marker nicht erfasst werden, ist dieses Ergebnis biologisch plausibel.

Unter den definierbaren Immunzell-Clustern fanden sich vier Lymphozyten-Cluster. Neben (CD8⁺, CD3⁺) zytotoxischen-T-Zellen, (CD4⁺, CD3⁺) T-Helfer Zellen und (CD20⁺, HLA-DR⁺) B-Zellen, fand sich auch ein gemischtes Cluster, welches a.e. aktivierte Lymphozyten abbildet (CD8⁺, CD4⁺, CD3⁺, CD20⁺, HLA-DR⁺).

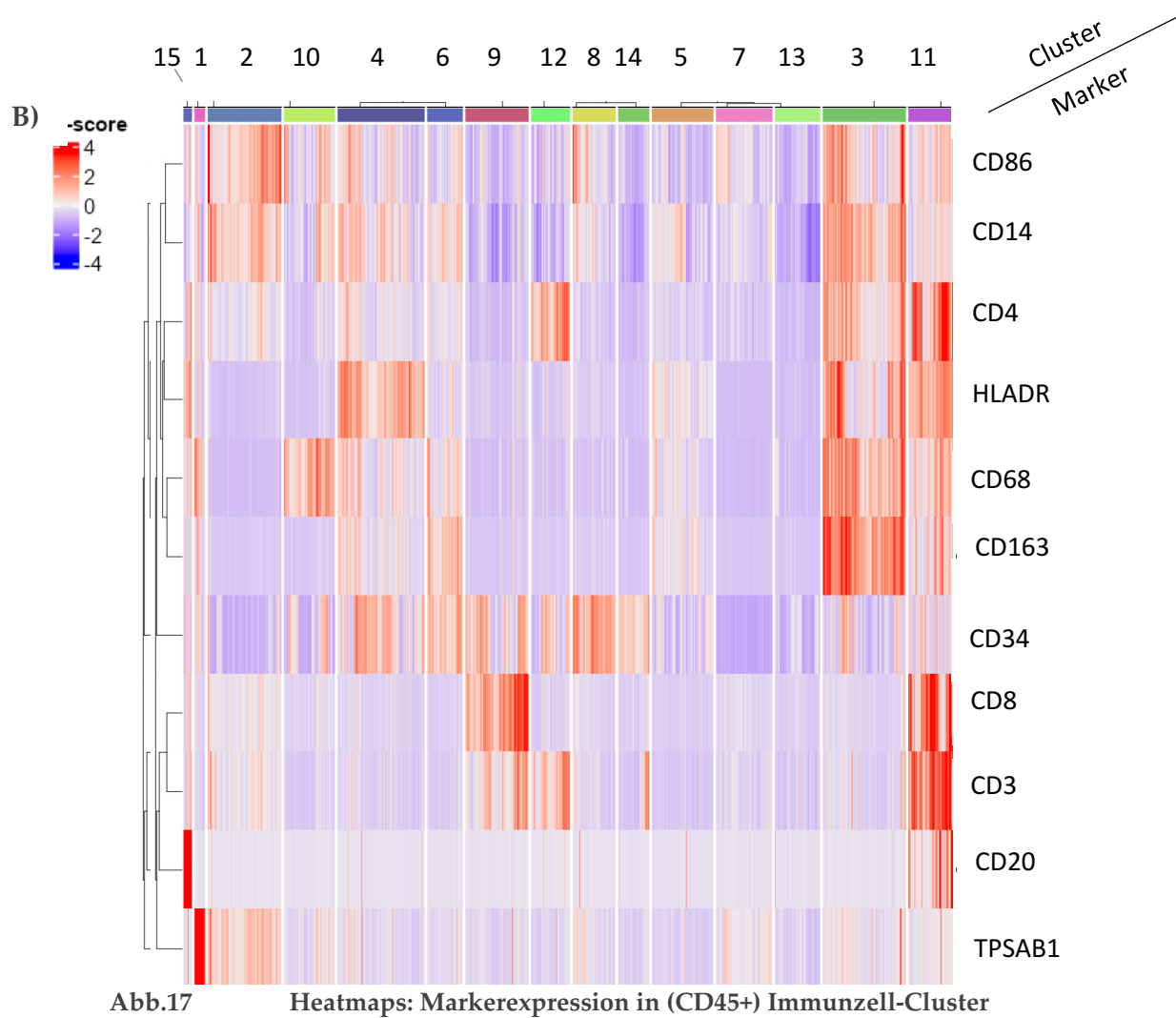
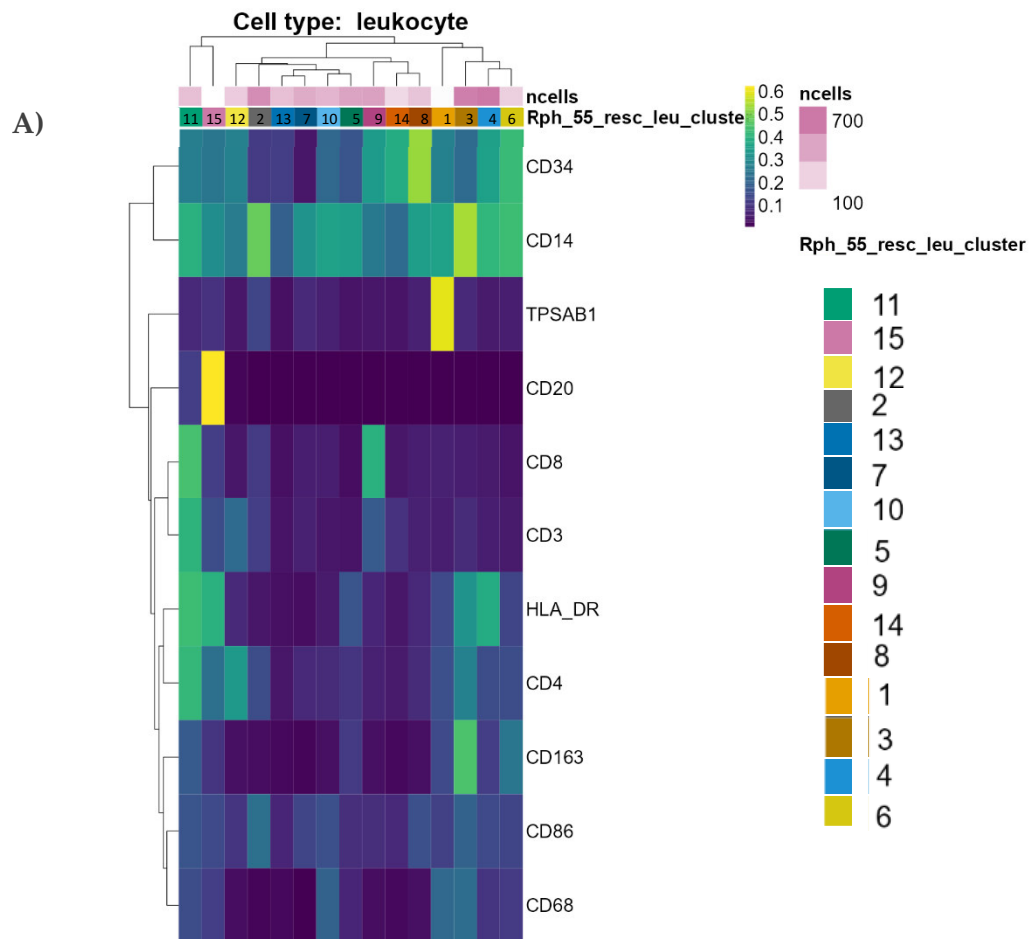
Daneben konnten noch zwei distinkte Monozyten-Cluster identifiziert werden, welche sich in CD86 und HLA-DR Expression voneinander unterscheiden (CD14⁺, CD68⁻, CD86^{high}; CD14⁺, CD68⁻ HLA-DR^{high}). Ob es sich tatsächlich um zwei grundsätzlich separate Monozytenpopulationen handelt oder die Cluster verschiedene, fluktuierende Aktivitätszustände von Monozyten einer Population darstellen (CD86^{high} Monozyten: proinflammatorisch vs. HLA-DR^{high} Monozyten: Antigenpräsentation und Immunmodulation), ließ sich aus den vorliegenden Daten nicht beantworten. Unter den identifizierten Makrophagen Clustern fanden sich zwei CD163⁺ M2 Makrophagen Cluster, welche sich in der Expressionshöhe von CD163 sowie HLA-DR Expression voneinander abgrenzten (CD163^{high}, HLA-DR⁺, CD14⁺, CD68⁺; CD163⁺, HLA-DR⁻, CD14⁺, CD68⁺) sowie ein weiteres HLA-DR- Makrophagen-Cluster, welches sich aufgrund des Expressionsmusters mit den vorhandenen Markern nicht sicher einer einzelnen bekannten Makrophagen-Subpopulation zuordnen ließ (CD68⁺, CD86^{low}, HLA-DR⁻).

Zu guter Letzt zeigte sich eine Population CD68⁺ Mastzellen (CD68⁺, TPSAB1⁺), die sich in **Abb. 6** in reduzierten Dimensionen, mit am deutlichsten von den übrigen Immunzell-Clustern separiert präsentierte. CD68⁺ Mastzellen wurden, in dieser Form im Herzen noch nicht beschrieben. Eine Beschreibung findet sich in der Literatur lediglich im Tumorkontext. Allerdings konnte aufgrund der Lage der Detektionskanäle (115In/TPSAB1 und 175Lu/CD68) ein *spillover*-Artefakt ausgeschlossen werden. Auch in der Kontrolle im Bild (siehe **Abb. 18**) ließen sich die doppelpositiven Zellen eindeutig darstellen. Es fiel auf, dass sämtliche CD68⁺ Mastzellen eine THY1 Koexpression zeigten.

Tabelle 8 (CD45+) Immunzell-Cluster Marker und biologische Cluster-Bezeichnung

Cluster#	Cluster-definierende Marker	Cluster-Bezeichnung
Cluster1	TPSAB1 ⁺ , CD68 ⁺	CD68 ⁺ Mastzellen
Cluster2	CD14 ⁺ , CD68 ⁻ , CD86 ^{high} ,	CD86 ^{high} Monozyten
Cluster 3	CD163 ^{high} , HLA-DR ⁺ , CD14 ⁺ , CD68 ⁺	CD16 ^{high} (HLA-DR ⁺) M2-Makrophagen
Cluster4	CD14 ⁺ , CD68 ⁻ HLA-DR ^{high}	HLA-DR ^{high} Monozyten
Cluster5	undefiniert	undefiniert
Cluster6	CD163 ⁺ , HLA-DR ⁻ , CD14 ⁺ , CD68 ⁺	CD163 ⁺ (HLA-DR ⁻) M2-Makrophagen
Cluster7	undefiniert	undefiniert
Cluster8	undefiniert	undefiniert
Cluster 9	CD8 ⁺ , CD3 ⁺	Zytotoxische T Zellen
Cluster 10	CD68 ⁺ , CD86 ^{low} , HLA-DR ⁻	HLA-DR ⁻ Makrophagen
Cluster 11	CD8 ⁺ , CD4 ⁺ , CD3 ⁺ , CD20 ⁺ , HLA-DR ⁺	Aktivierte Lymphozyten
Cluster 12	CD4 ⁺ , CD3 ⁺	T-Helfer Zellen
Cluster13	undefiniert	undefiniert
Cluster14	undefiniert	undefiniert
Cluster 15	CD20 ⁺ , HLA-DR ⁺	CD20 ⁺ B-Zellen

Expression: +positiv; - negativ; high hoch; low niedrig



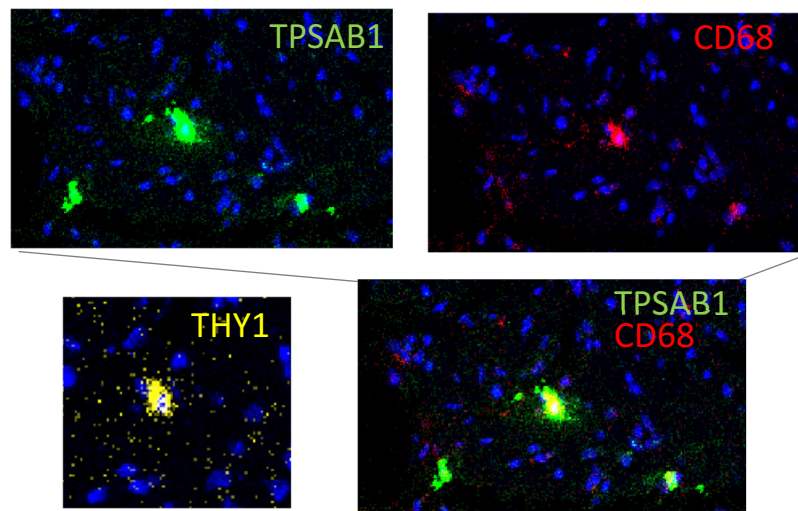


Abb. 18 Darstellung der CD68⁺TPSAB1⁺ Zellen im Bild: ■: TPSAB1, ■: CD68, ■: THY1

3.2.2. CD45- Nicht-Immunzell-Cluster

Im Vergleich zu den Zellen im CD45⁺ Gate ist die erwartbare Heterogenität im CD45⁻ Gate deutlich größer, da alle myokardialen Zellen außerhalb der Immunzellnische enthalten sein sollten. Neben Kardiomyozyten werden durch das Panel insbesondere vaskuläre Zellen und Stromazellen abgebildet. Trotz pathophysiologisch großer Relevanz wurden diese Zellpopulationen in bisherigen Studien zur zellulären Komposition im Myokard bei SSc-pHI nie im Detail untersucht.

Es konnten 21 Nicht-Immunzell-Cluster identifiziert werden. Abb. 19 stellt diese in reduzierter Dimension dar (oben: UMAP, sowie ergänzend zur besseren lokalen Auflösung, unten: *t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding*, t-SNE). Es fiel auf, dass die Cluster, verglichen mit den CD45⁺ Immunzellclustern, etwas weniger klar voneinander separiert sind, was teilweise an der deutlich höheren Gesamtzellzahl im CD45⁻ Gate, zum anderen an der großen Heterogenität der eingeschlossenen Zellpopulationen liegt.

Abb. 20 zeigt zwei Varianten *Heatmaps* in welchen die Markerexpression in den identifizierten Nicht-Immunzell-Clustern deutlich gemacht wird. Während die Expression einiger Marker prinzipiell sehr zelltyp-spezifisch sind (z.B. TNNT2 für Kardiomyozyten), werden andere Marker von verschiedenen Zelltypen exprimiert z.B. SOX9 oder CD34. Bei Betrachtung der *Heatmaps* wird auch deutlich, dass der Hintergrund und die Stärke der „Färbung“ teils sehr unterschiedlich sind; dies wurde in der Interpretation der Daten berücksichtigt.

In Tabelle 9 werden die Nicht-Immunzell-Cluster samt Cluster-definierender Marker und Benennung aufgelistet.

Zwei Cluster blieben negativ für die ausgewählten Marker im Panel und konnten daher nicht näher bestimmt werden.

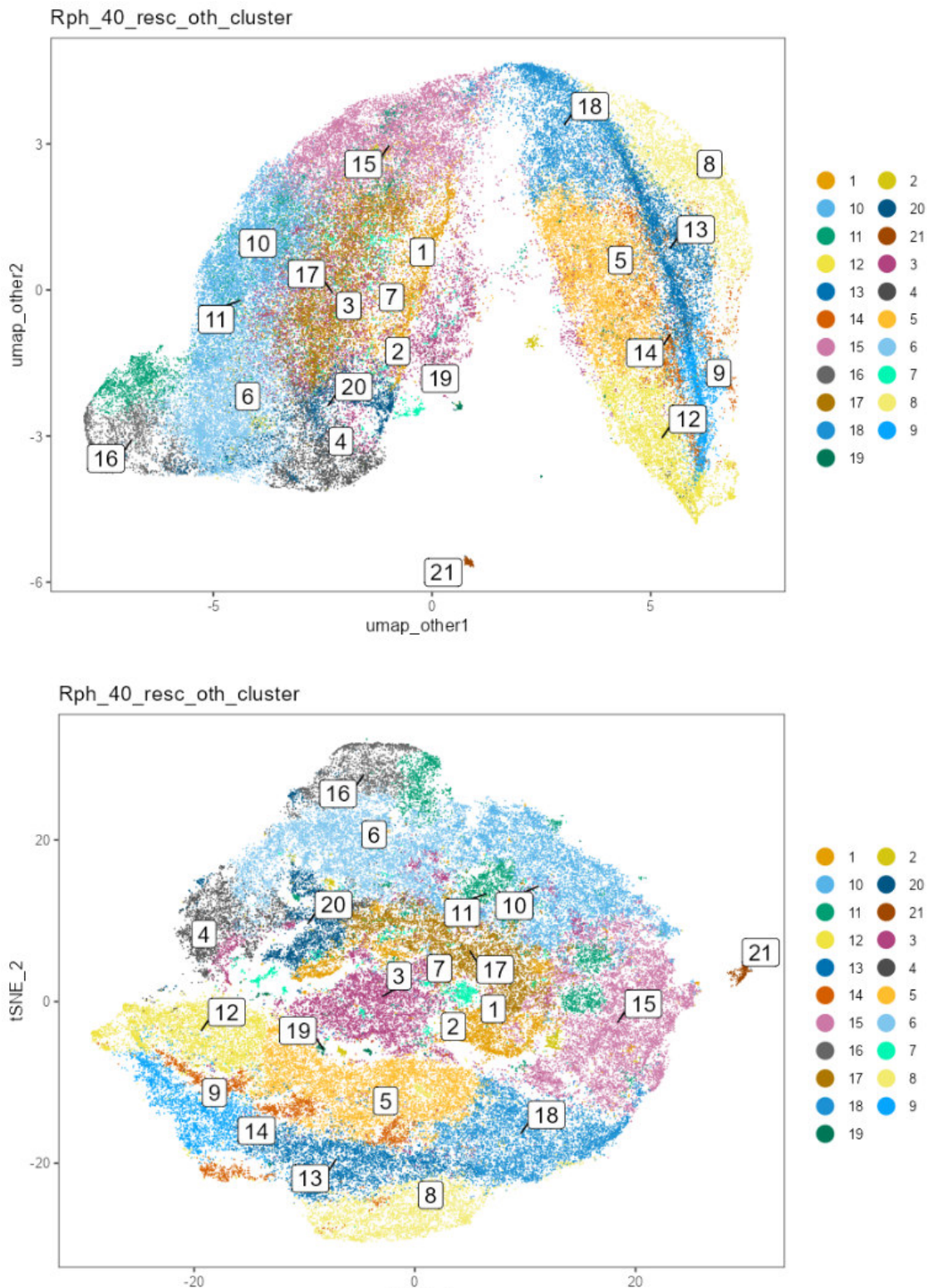


Abb.19 (CD45-) Nicht-Immunzell-Cluster: Darstellung in reduzierten Dimensionen: oben: UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection); unten: tSNE (t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding). Das Clustering erfolgte mittels RPhenograph Algorithmus mit $k = 55$ und rescaled Datensatz. In der Legende farblich codiert und im Plot nummeriert sind jeweils die 21 identifizierten Nicht-Immunzell-Cluster.

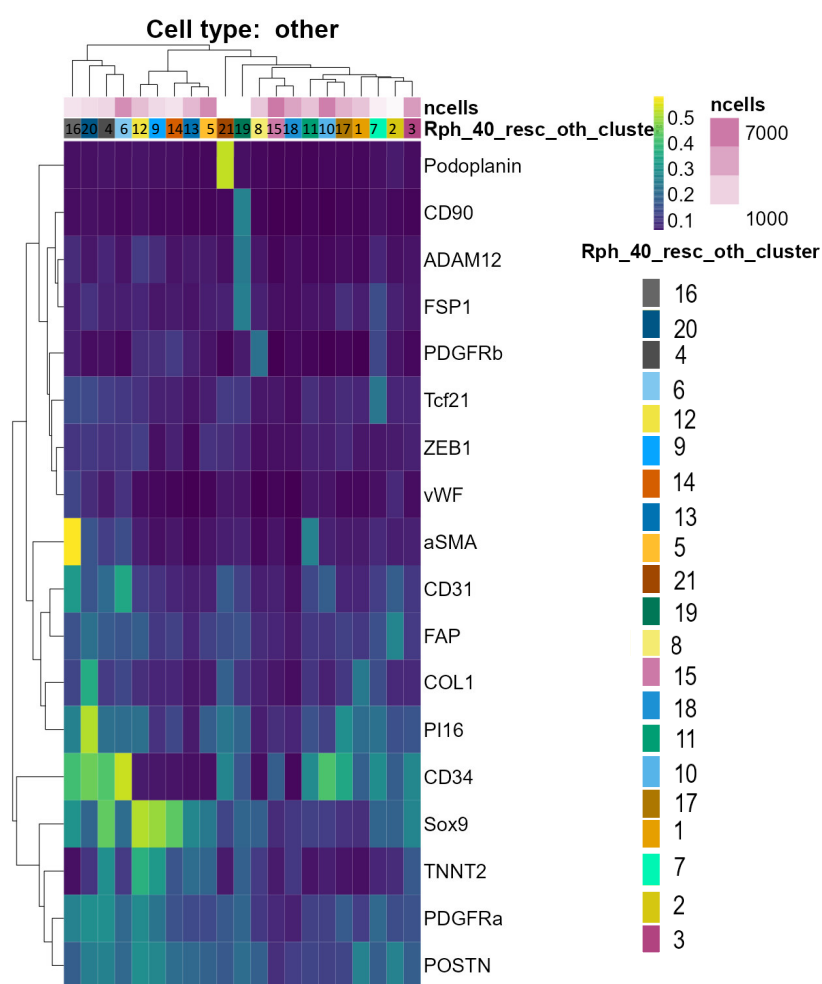
Als funktionstragende Zellen des Myokards machten Kardiomyozyten einen großen Teil der Nicht-Immunzellen aus. In den vorliegenden Daten konnten sechs unterschiedliche Kardiomyozyten-Cluster gefunden werden, welche sich durch die Expressionsstärke von TNNT2, SOX9, PI16 und CD34 voneinander unterschieden (Für Details siehe Tabelle 9). Da der Fokus des Projektes insbesondere auf der Stromazellen und Immunzellen lag, wurde in der weiteren Analyse nicht näher auf die Kardiomyozyten-Subpopulationen eingegangen und sämtliche Kardiomyozyten-Cluster als „Kardiomyozyten“ zusammengefasst.

Unter den identifizierten Stromazellen fielen 2 Cluster mit ECM produzierenden Stromazellen auf, welche in der PI16 Expression und in der Expressionshöhe von COL1A1 differierten (COL1A1⁺, POSTN⁺, PI16⁻, CD34⁻ und COL1A1^{high}, POSTN⁺, PI16^{high}, CD34⁺). Auch ein FAP high+ Cluster scheint mit der Produktion von POSTN an der Produktion von ECM beteiligt zu sein (FAP^{high}, POSTN⁺, COL1A1⁺). Die funktionellen Rollen von THY1⁺, ADAM12⁺, FSP1⁺ Stromazellen, CD34⁺(CD31⁻, FSP1^{low}, PI16^{low}) Stromazellen und SOX9^{high} Stromazellen lassen sich aus den definierenden Markern nicht direkt ableiten. Daneben stellt sich ein Cluster residenter (TCF21⁺) myokardialer Fibroblasten sowie α -SMA⁺ Stromazellen (α -SMA⁺, CD31⁻, CD34^{low}), welche im Folgenden als Myofibroblasten bezeichnet werden, dar. Grundsätzlich ist es schwierig Stromazellen eindeutig als Fibroblasten zu klassifizieren. Es gibt bis dato keinen bekannten hoch-spezifischen (exklusiven) Pan-Fibroblasten Marker (Auch PDGFRA zeigte nicht das erhoffte spezifische Fibroblasten *pattern*).

Unter den vaskulären Zellen zeigten sich zwei Endothelzell-Cluster, die sich in Expressionsprofil von CD34 und CD31 voneinander abgrenzten (CD34^{high}, CD31^{high} und CD34⁺, CD31^{low}), sowie ein (PDPN^{high}) Cluster aus lymphatischen Endothelzellen

Als Zellen der Gefäßwand konnte ein Cluster mit (PDGFRB⁺) Perizyten identifiziert werden, sowie ein Cluster aus Endothelzellen und VSMCs der Gefäßwand (α -SMA^{high}, CD31⁺, CD34⁺).

A)



B)

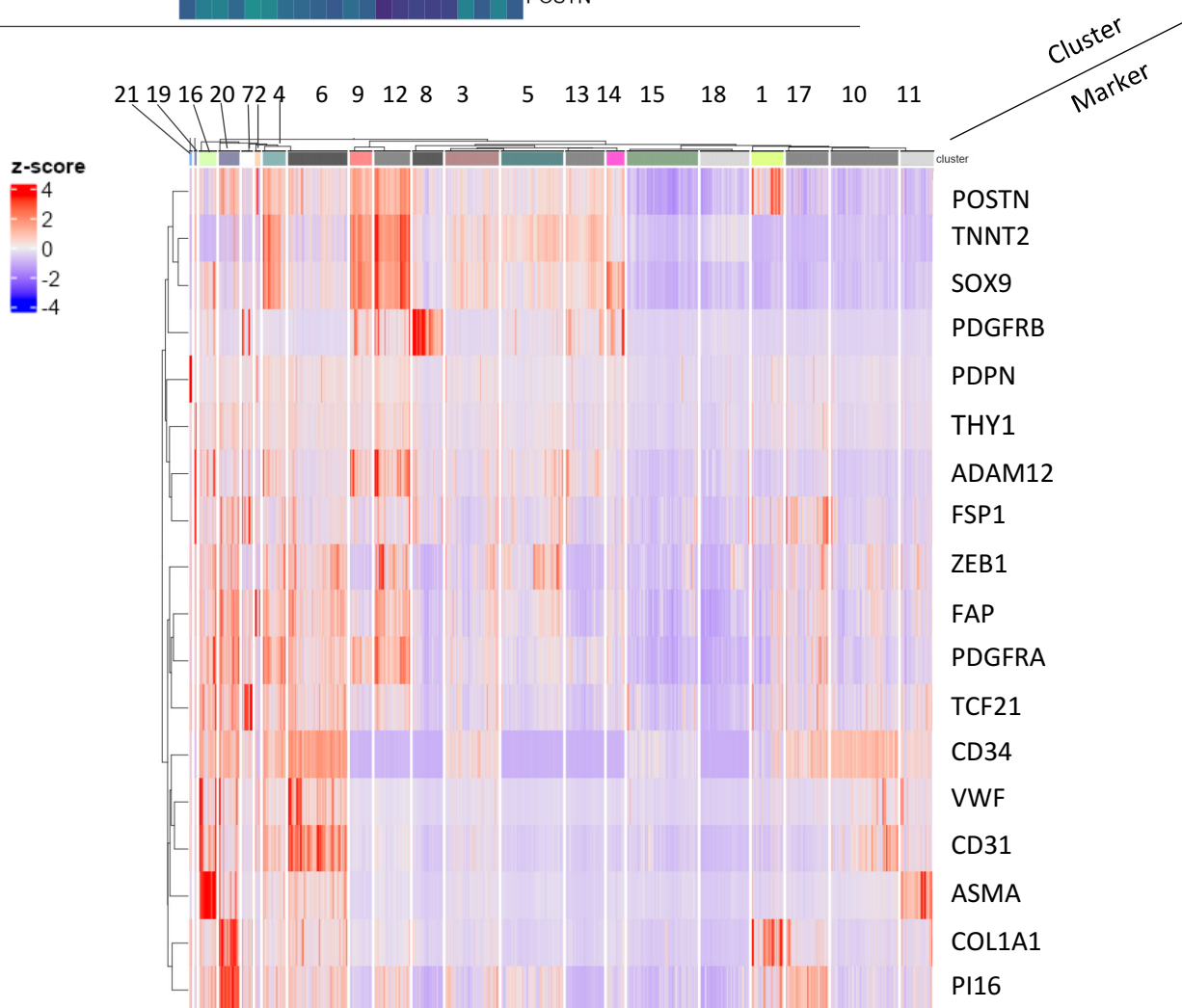


Abb.20 Heatmaps: Markerexpression in (CD45-) Nicht-Immunzell-Cluster

Tabelle 9 (CD45-) Nicht-Immunzell-Cluster Marker und biologische Cluster-Bezeichnung

Cluster#	Cluster-definierende Marker	Cluster Bezeichnung
Cluster1	COL1A1 ⁺ , POSTN ⁺ , PI16 ⁻ , CD34 ⁻	PI16 ⁻ ECM produzierende Stromazellen
Cluster2	FAP ^{high} , POSTN ⁺ , COL1A1 ⁻	FAP ^{high} /POSTN ⁺ Stromazellen
Cluster 3	TNNT2 ^{low} , Sox9 ^{low} , PI16 ^{low} , CD34 ^{low}	Kardiomyozyten Cluster 1
Cluster4	TNNT2 ^{high} , SOX9 ^{high} , PI16 ⁻ , CD34 ⁺	Kardiomyozyten Cluster 2
Cluster5	TNNT2 ^{low} , SOX9 ^{low} , PI16 ^{low} , CD34 ⁻	Kardiomyozyten Cluster 3
Cluster6	CD34 ^{high} , CD31 ^{high}	CD34 ^{high} /CD31 ^{high} Endothelzellen
Cluster7	TCF21 ⁺	Residente Fibroblasten
Cluster8	PDGFRb ⁺	Perizyten
Cluster 9	TNNT2 ^{high} , SOX9 ^{high} , PI16 ⁻ , CD34 ⁻	Kardiomyozyten Cluster 4
Cluster 10	CD34 ⁺ , CD31 ^{low}	CD34 ⁺ /CD31 ^{low} Endothelzellen
Cluster 11	α-SMA ⁺ , CD31 ⁻ , CD34 ^{low}	Myofibroblasten
Cluster 12	TNNT2 ^{high} , SOX9 ^{high} , PI16 ^{low} , CD34 ⁻	Kardiomyozyten Cluster 5
Cluster13	TNNT2 ^{low} , SOX9 ^{low} , PI16 ⁻ , CD34 ⁻	Kardiomyozyten Cluster 6
Cluster14	SOX9 ⁺ , TNNT2 ⁻	SOX9 ⁺ Stromazellen
Cluster 15	undefiniert	Undefinierte Nicht-Immunzellen
Cluster 16	α-SMA ^{high} , CD31 ⁺ , CD34 ⁺	VSMC/Endothelzellen
Cluster 17	CD34 ⁺ , CD31 ⁻ , FSP1 ^{low} , PI16 ^{low}	CD34 ⁺ Stromazellen
Cluster 18	undefiniert	Undefinierte Nicht-Immunzellen
Cluster 19	THY1 ⁺ , ADAM12 ⁺ , FSP1 ⁺	THY1 ⁺ / ADAM12 ⁺ / FSP1 ⁺ Stromazellen
Cluster 20	COL1A1 ^{high} , POSTN ⁺ , PI16 ^{high} , CD34 ⁺	PI16 ^{high} ECM produzierende Stromazellen
Cluster 21	PDPN ^{high} , CD31 ^{low} , CD34 ^{low}	Lymphatische Endothelzellen

ECM, extrazelluläre Matrix; Expression: +positiv; - negativ; **high** hoch; **low** niedrig

3.3. Vergleichende Analyse der Zell-Cluster zwischen verschiedenen Krankheitsentitäten

3.3.1. Prozentualer Vergleich der CD45⁺ und CD45⁻ Zellen

Betrachtet man lediglich die Immunzell- bzw. Nicht-Immunzell- Häufigkeit (CD45⁺/CD 45⁻ Zellen), so sind die Unterschiede zwischen den Krankheitsentitäten (wie in **Tabelle 10** zu sehen) marginal. In allen Entitäten von entzündlich-fibrotischen Myokarderkrankungen lassen sich (CD45⁺) Immunzellinfiltrate nachweisen (a-HI > i-HI > SSc-pHI).

	a-HI	i-HI	SSc-pHI
CD45 ⁺ Gate	8,6%	6,92%	8,00%
CD45 ⁻ Gate	91,4%	93,1%	92,0%

Tabelle 10 Häufigkeit CD45⁺ Zellen in den unterschiedlichen untersuchten Krankheitsentitäten: aHI, Herzbeteiligung im Rahmen einer systemischen Autoimmunerkrankung (nicht SSc); i-HI, idiopathische Myokarditis; SSc-pHI, Herzbeteiligung im Rahmen einer Systemischen Sklerose

3.3.2. Vergleich der Zellcluster zwischen den Krankheitsentitäten

3.3.2.1. Allgemeine Übersicht

Betrachtet man die Häufigkeitsunterschiede jedoch auf Ebene der identifizierten Cluster (**Abb. 21**, Häufigkeit in % der Gesamtzellen pro Entität), so werden existierende Unterschiede in der zellulären Komposition zwischen den Krankheitsentitäten erstmals offensichtlich, welche in früheren Untersuchungen mit konventionellen, niedrig-dimensionalen (=low-plex) Techniken, verborgen geblieben waren.

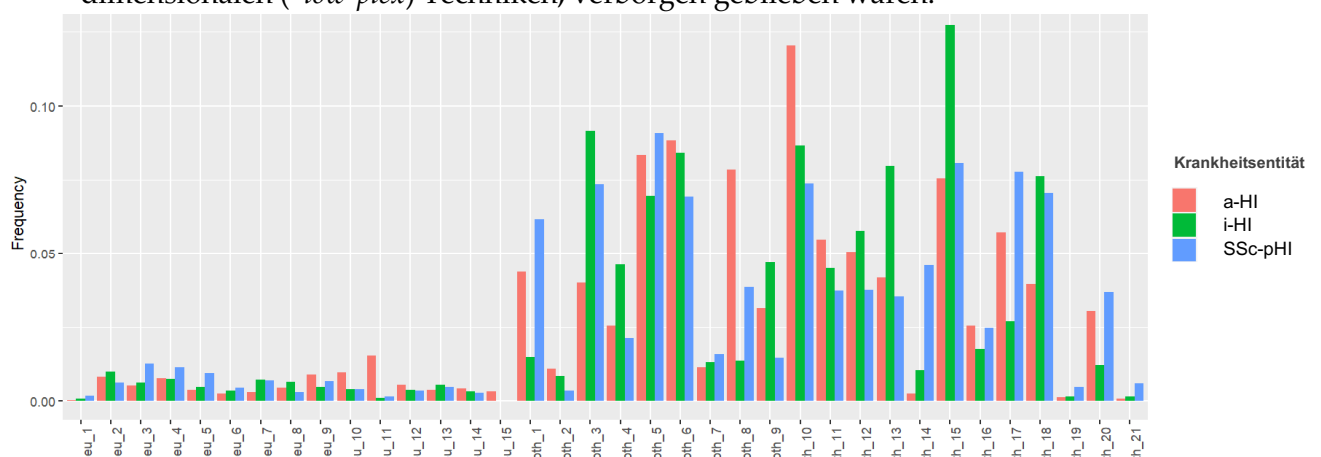


Abb. 21 Häufigkeitsverteilung der Cluster in verschiedenen Krankheitsentitäten: Frequency, Häufigkeit (in %/Gesamtzellen pro Entität) von CD45⁺ Immunzell-Cluster (=leu_1-15) und CD45⁻ Nicht-Immunzell-Cluster (=oth_1-21) zwischen unterschiedlichen Krankheitsentitäten: a-HI, Herzbeteiligung im Rahmen systemischer Autoimmunerkrankungen (nicht SSc), i-HI, idiopathische Myokarditis, SSc-pHI (primäre Herzbeteiligung im Rahmen einer systemischen Sklerose)

An sich sind die identifizierten Cluster nicht entitätsspezifisch – allerdings kommen sie in den verschiedenen entzündlich-fibrotischen Erkrankungen in unterschiedlicher Relation vor. Immunzell-Cluster 15 (leu15), welches (CD20⁺) B-Zellen repräsentiert, wird insgesamt nur in sehr wenigen Proben (hauptsächlich a-HI) gefunden. Da im Gewebe i.d.R. (CD20⁻) Plasmazellen dominieren, ist die fast Abwesenheit von B-Zellen bei genauer Betrachtung nicht wirklich erstaunlich. Eine repräsentative Impression über die grundsätzliche räumliche Verteilung unterschiedlicher Zellgruppen (respektive Immunzellen, Kardiomyozyten, Stromazellen und vaskuläre Zellen) gibt Abb. 22 Impression über die räumliche Verteilung unterschiedlicher Zellpopulationen in unterschiedlichen Krankheitsentitäten.

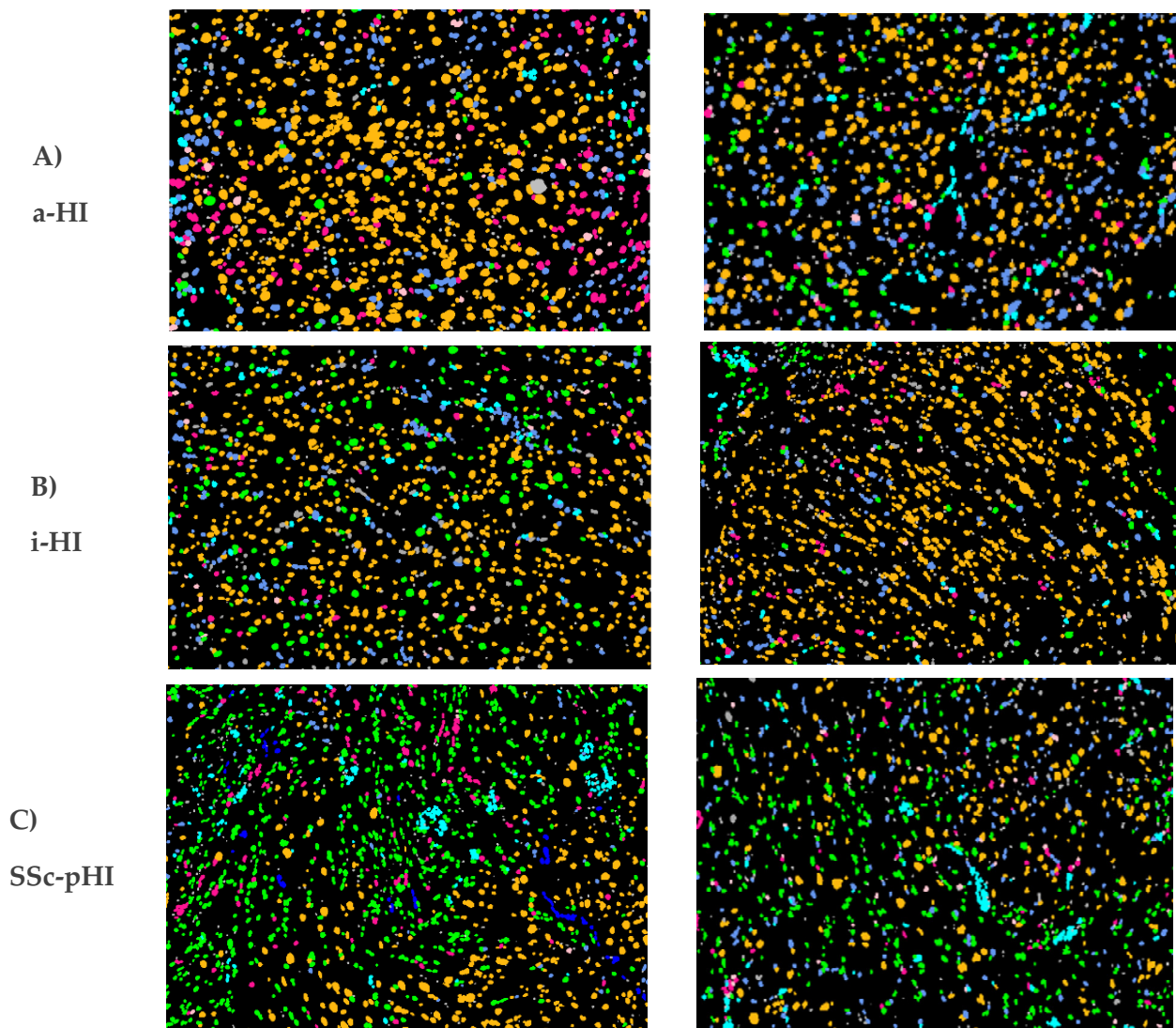


Abb. 22 Impression über die räumliche Verteilung unterschiedlicher Zellpopulationen in unterschiedlichen Krankheitsentitäten A) aHI, Herzbeteiligung im Rahmen einer systemischen Autoimmunerkrankung (nicht SSc); B) i-HI, idiopathische Myokarditis; C) SSc-pHI, Herzbeteiligung im Rahmen einer Systemischen Sklerose; Es wurden jeweils zufällig repräsentative Ausschnitte aus zwei ROIs pro Krankheitsentität ausgewählt; ●: Immunzellen, ●: undefinierte Immunzellen, ●: Kardiomyozyten, ●: Stromazellen, vaskuläre Zellen (●: lymphatische Endothelzellen, ●: Endothelzellen, ●: Zellen der Gefäßwand), ●: undefinierte Nicht-Immunzellen

3.3.2.2 Entitätsspezifischen Unterschiede in den Zellpopulationen und Literaturvergleich mit gesundem Myokard

Durch die allgemeinen Fortschritte in der Einzelzell-Analyse wurde es in den letzten Jahren erstmals möglich, die zelluläre Komposition des Myokards detaillierter aufzuschlüsseln. Eine Meilensteinpublikation stellt dabei die Arbeit von *Litviňuková et al. (2020)*, "Cells of the adult human heart" dar. In dieser Studie wurde mithilfe von Single-Cell-Sequenzierungstechnologien u.a. single-cell RNA Sequenzierung (scRNA-Seq) die zelluläre Komposition in verschiedenen Bereichen des gesunden adulten Herzens analysiert. Für das vorliegende Projekt wurden EMBs aus dem rechten Ventrikel entnommen. Die relative Zusammensetzung der Zellpopulationen im (gesunden) rechten Ventrikelmyokard (basierend auf den Daten der scRNA-Seq von *Litviňuková et al.*), wurde zur Plausibilitätsprüfung in **Abb. 23** aufbereitet.

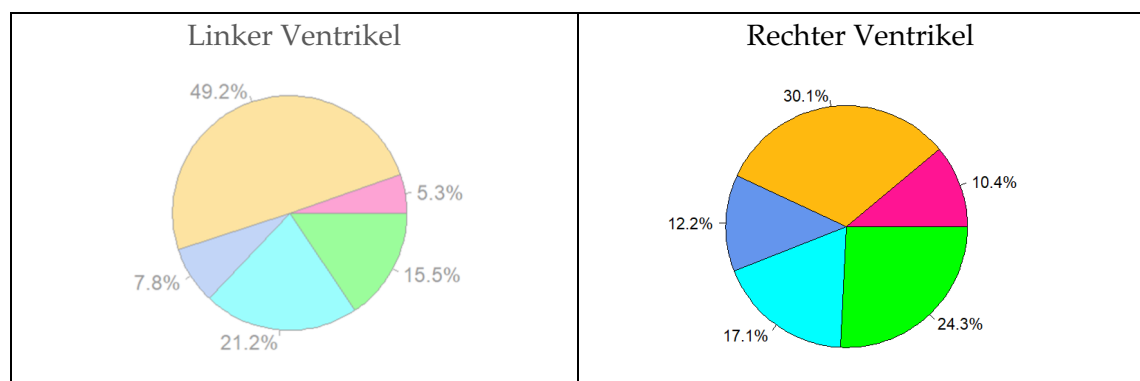


Abb. 23 Komposition der Zellpopulationen im Gesunden Myokard - basierend auf publizierten Daten von *Litviňuková et al. (2020)*: ▲: Immunzellen, ▲: Kardiomyozyten, ▲: Endothelzellen, ▲: Zellen der Gefäßwand, ▲: Stromazellen

In **Abb. 24** ist die Häufigkeitsverteilung der Zellpopulationen in den verschiedenen Krankheitsentitäten aus den vorliegenden Daten dargestellt. Da im IMC-Datensatz, im Vergleich zum scRNA-Seq-Datensatz, Zellen undefiniert bleiben, ist der direkte intermodale Vergleich erschwert. Zumindest für die scRNA-Seq Analyse Gewebeproben enzymatisch oder mechanisch verdaut werden, was die *Recovery* gewisser Zellpopulationen beeinträchtigen kann. Im Großen und Ganzen zeigten sich jedoch in der präsentierten Größenordnung plausible Werte. Die Zellcluster wurden zu folgenden großen Zellpopulationen zusammengefasst:

- Immunzellen: alle identifizierten Leukozyten-Cluster aus dem CD45⁺ Gate
- Kardiomyozyten: alle 6 Kardiomyozyten Cluster
- Endothelzellen: CD34^{high}/CD31⁺ Endothelzellen, CD34⁺/CD31^{low}- Endothelzellen, lymphatische Endothelzellen
- Zellen der Gefäßwand: Perizyten, VSMCs
- Stromazellen: PI16⁻ ECM produzierende Zellen, PI16⁺ ECM produzierende Zellen, Myofibroblasten, FAP^{high}/POSTN⁺ Stromazellen, CD34⁺ Stromazellen, SOX9⁺ Stromazellen, THY1⁺/ ADAM12⁺/ FSP1⁺ Stromazellen, residente Fibroblasten
- Undefinierte Nicht Immunzellen

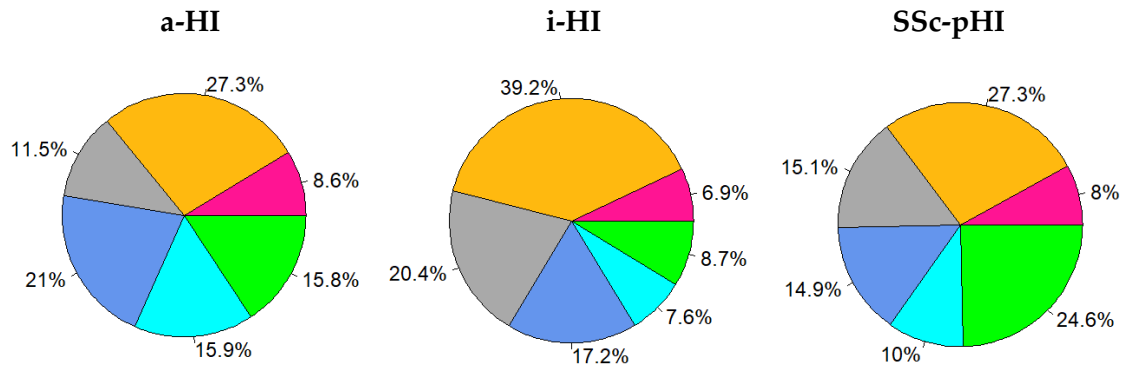


Abb. 24 Häufigkeitsverteilung der Zellpopulationen in Krankheitsentitäten: (%/ alle Zellen in einer Krankheitsentität a-HI, Herzbeteiligung im Rahmen systemischer Autoimmunerkrankungen (nicht SSc); i-HI, idiopathische Myokarditis; SSc-pHI, primäre Herzbeteiligung im Rahmen einer Systemischen Sklerose (SSc). ▲: Immunzellen, ▲: Kardiomyozyten, ▲: Endothelzellen, ▲: Zellen der Gefäßwand, ▲: Stromazellen; ▲: undefinierte Nicht-Immunzellen

Im Vergleich zwischen den Krankheitsentitäten fiel in der SSc-pHI im Vergleich zu den anderen beiden Entitäten eine relative Expansion der Stromazellen (und relativ gesehene Rarefizierung der vaskulären Zellpopulation) auf. In der a-HI präsentierte sich die vaskulären Zellen hingegen relativ expandiert. Ob dieser Beobachtung eine tatsächliche Gefäßrarefizierung (im Rahmen der SSc-Vaskulopathie) sowie Fibroblasten Akkumulation (im Rahmen der Fibrosereaktion) in der SSc-pHI bzw. Hypervaskularisation/Angiogeneseinduktion in der a-HI zugrunde liegt, kann jedoch nicht mit Sicherheit gesagt werden. Die absoluten Zellzahlen können nicht verglichen werden aufgrund der unterschiedlichen Patientenzahlen sowie unterschiedlicher ROI Gesamtgrößen. Eine Normierung auf z.B. Kardiomyozyten ist ebenfalls nicht möglich, da es im Rahmen der Pathologie in individuell unterschiedlichem Maße zu Kardiomyozyten-Nekrosen kommt.

3.3.3 Detaillierte vergleichende Betrachtung der (CD45⁺) Immunzell-Cluster

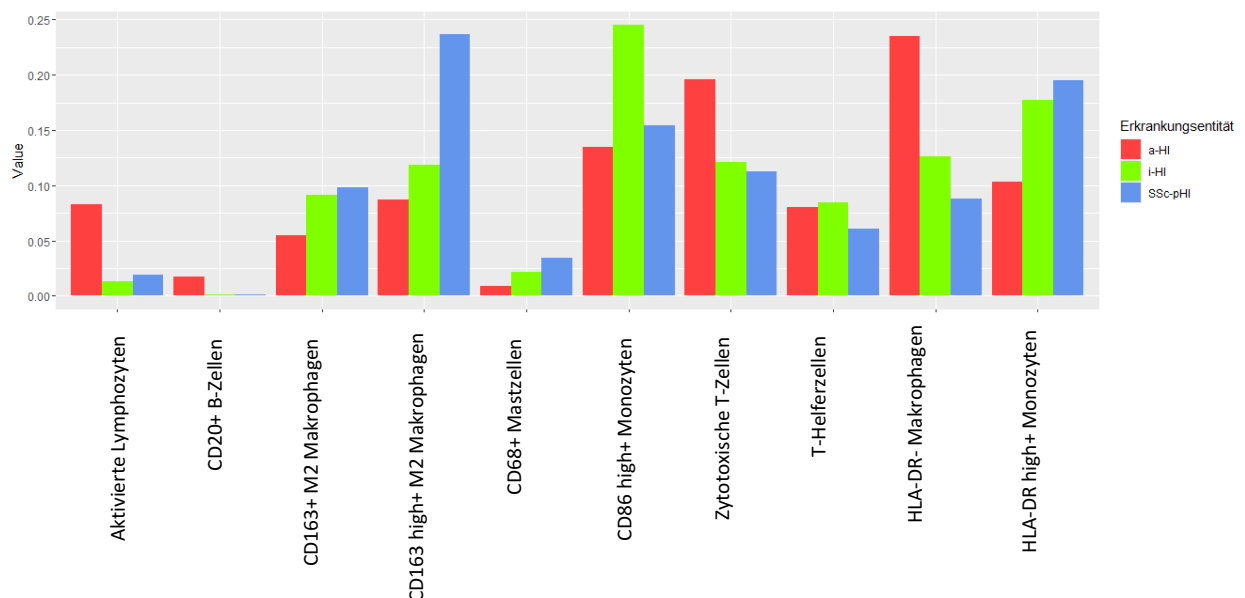
In Abb. 25 wurde die Häufigkeitsverteilung noch einmal mit Fokus auf die (CD45⁺) Immunzell-Cluster dargestellt. Verglichen wurden hierbei jeweils die Mittelwerte der patientenspezifischen relativen Häufigkeit der einzelnen (definierten) Immunzell-Cluster, normiert auf die gesamte (definierte) Immunzell-Population des jeweiligen Patienten, separat für jede Erkrankungsentität. Ergänzend soll der *radar chart* in Abb. 26 dabei helfen, die charakteristischen Unterschiede zwischen den Krankheitsentitäten herauszuarbeiten.

Trotz ähnlicher Gesamt-Immunzellhäufigkeit (Häufigkeit CD45⁺ Zellen, siehe Tabelle 10Tabelle), werden im Zoom auf die Immunzell-Cluster, deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der entzündlichen Infiltrate zwischen den Krankheitsentitäten demarkiert. In der a-HI dominierten insbesondere (aktivierte) Lymphozyten sowie HLA-DR⁺ Makrophagen. Im Vergleich dazu zeigten sich in der SSc-pHI gehäuft CD163⁺

M2-Makrophagen. (Da Makrophagen vom M2-Typ bekanntermaßen eine zentrale Rolle im Gewebe-*Remodeling* und Fibrosebildung spielen, wird in der Diskussion noch einmal genauer auf diese Beobachtung eingegangen.) Auch HLA-DR^{high} Monozyten und CD68⁺ Mastzellen wurden häufiger in der der SSc-pHI, als in den anderen beiden Gruppen, aufgefunden.

Es stellte sich heraus, dass - mit Ausnahme einer Tendenz für CD86^{high} Monozyten - in der i-HI (trotz Nachweis von entzündlichen CD45⁺ Infiltraten) Immunzellen vorherrschen, die durch das aktuelle Panel nicht charakterisiert werden können (Siehe hierfür auch Abb. 21). Die i-HI ist in der Literatur als einheitliche Krankheitsgruppe bislang nicht wirklich erfasst worden, so dass häufig sämtliche Fälle von Myokarditis-Nachweis ohne (bislang) erklärbare Ursache darunter subsumiert werden. Eine autoimmune Genese wird in diesen Fällen jedoch häufig angenommen. Die Daten können keine ätiologische Klärung liefern, legen jedoch nahe, dass sich die Immunzellkomposition in der i-Hi deutlich von der, der anderen beiden Entitäten unterscheidet.

Abb. 25 Häufigkeitsverteilung (CD45+) Immunzell-Cluster zwischen Krankheitsentitäten: Häufigkeit (in %); ■: a-HI, Herzbeteiligung im Rahmen systemischer Autoimmunerkrankungen (nicht SSc), ■: i-HI, idiopathische Myokarditis, ■: SSc-pHI, primäre Herzbeteiligung im Rahmen einer systemischen Sklerose



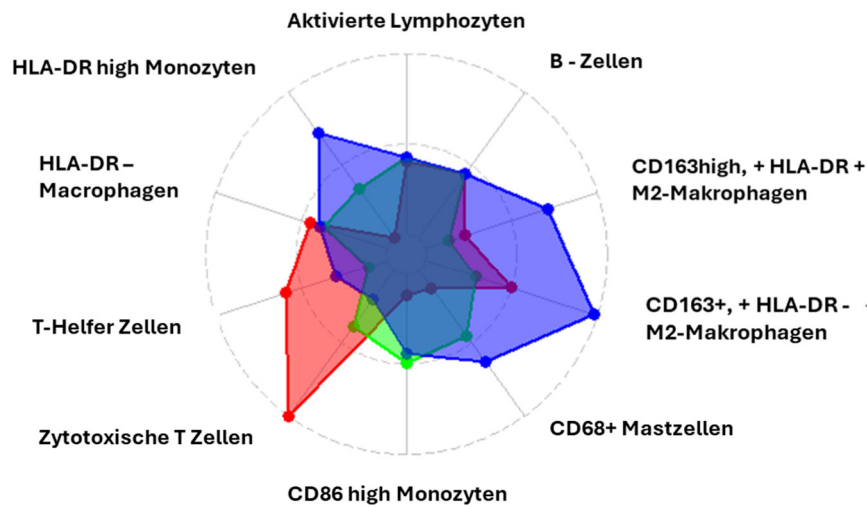


Abb. 26 Radar Chart: Definierte Immunzell-Cluster vs Krankheitsentität: z-rescaled Krankheitsentitäten: ■ **a-HI**, Herzbeteiligung im Rahmen systemischer Autoimmunerkrankungen (nicht SSc), ■ **i-HI**, idiopathische Myokarditis, ■ **SSc-pHI**, primäre Herzbeteiligung im Rahmen einer systemischen Sklerose

3.3.4. Vergleichende Betrachtung der CD45- Nicht Immunzell-Cluster

Die Häufigkeitsverteilung mit Fokus auf die definierten CD45-Nicht-Immunzellen wird in **Abb. 27** (Stromazellen) und **Abb. 29** (vaskuläre Zellen) abgebildet. Auch hier kann die Betrachtung der korrespondierenden *radar charts* (Stromazellen: **Abb. 28**, vaskuläre Zellen: **Abb. 30**) bei der Interpretation helfen, die charakteristischen Unterschiede zwischen den Krankheitsentitäten zu erfassen. Die Berechnung erfolgte an dieser Stelle parallel zu den Immunzellclustern (Darstellung von entitätsspezifischen Mittelwerten von patientenspezifischer relativer Häufigkeit von Zellsubclustern innerhalb einer Zellpopulation – d.h. Stromazellen oder vaskulärer Zellen). Die Kardiomyozyten-Cluster sollen an dieser Stelle nicht im Detail diskutiert werden.

Erneut ließ sich die i-HI durch die nachgewiesenen Cluster nicht wirklich erfassen (mit u.a. erneuter Häufung von unbestimmten Clustern, siehe hierfür ebenfalls **Abb. 21**)

Im Kontext der ausgeprägteren Fibrosereaktion in der SSc-pHI sind Stromazell-Cluster von besonders großem Interesse. Hier zeigt sich in der SSc-pHI eine Hochregulation von CD34⁺ Stromazellen sowie SOX9⁺ Stromazellen. Auch THY1⁺/ADAM12⁺/FSP1⁺ Stromazellen sowie PI16^{high} ECM (COL1A1 und POSTN) -produzierende Stromazellen sind in der SSc-pHI hochreguliert.

In der a-HI sind POSTN⁺/FAP^{high} Stromazellen sowie „klassische“ Myofibroblasten, welche sich selbst jedoch negativ für die Expression der im *panel* inkludierten ECM-Proteine COL1A1 sowie POSTN darstellen, erhöht.

In der vaskulären Zellpopulation sind keine relevanten Unterschiede zwischen den Entitäten auszumachen

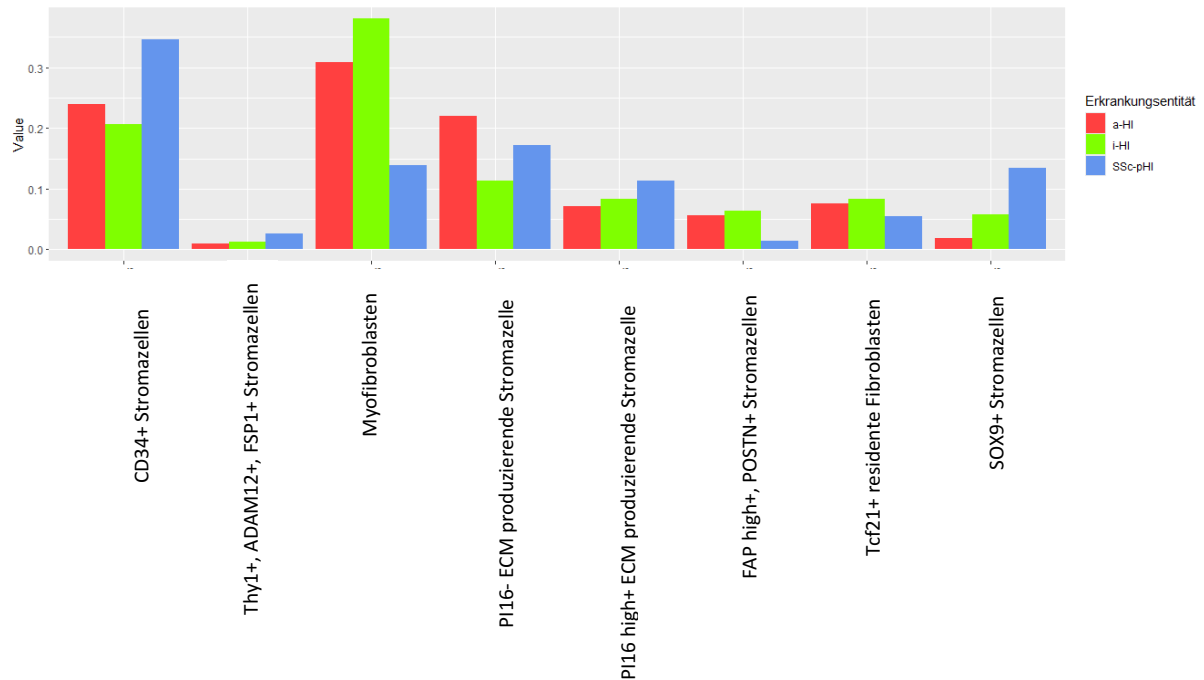


Abb. 27 Häufigkeitsverteilung definierte Stromazell-Cluster zwischen Krankheitsentitäten: Häufigkeit (in %); ■: a-HI, Herzbeteiligung im Rahmen systemischer Autoimmunerkrankungen (nicht SSc), ■: i-HI, idiopathische Myokarditis, ■: SSc-pHI, primäre Herzbeteiligung im Rahmen einer systemischen Sklerose

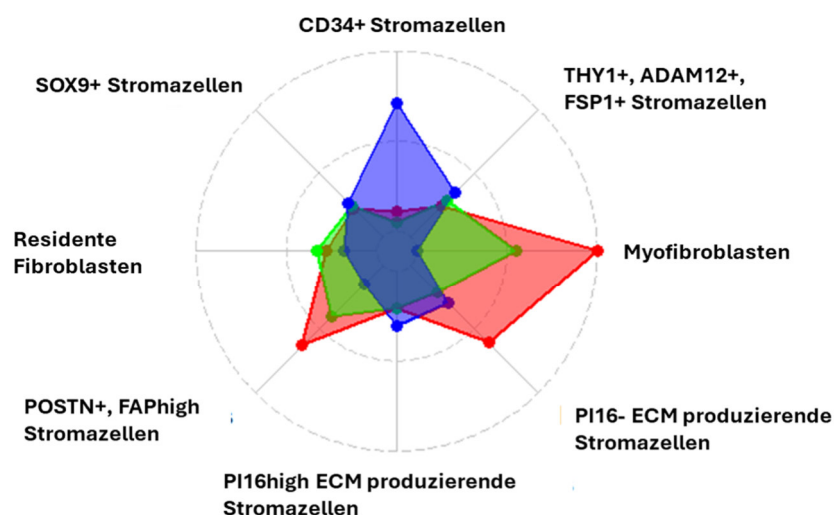


Abb. 28 Radar Chart: definierte Stromazell-Cluster vs Krankheitsentität: z-rescaled Daten; Krankheitsentitäten: ■: a-HI, Herzbeteiligung im Rahmen systemischer Autoimmunerkrankungen (nicht SSc), ■: i-HI, idiopathische Myokarditis, ■: SSc-pHI, primäre Herzbeteiligung im Rahmen einer systemischen Sklerose

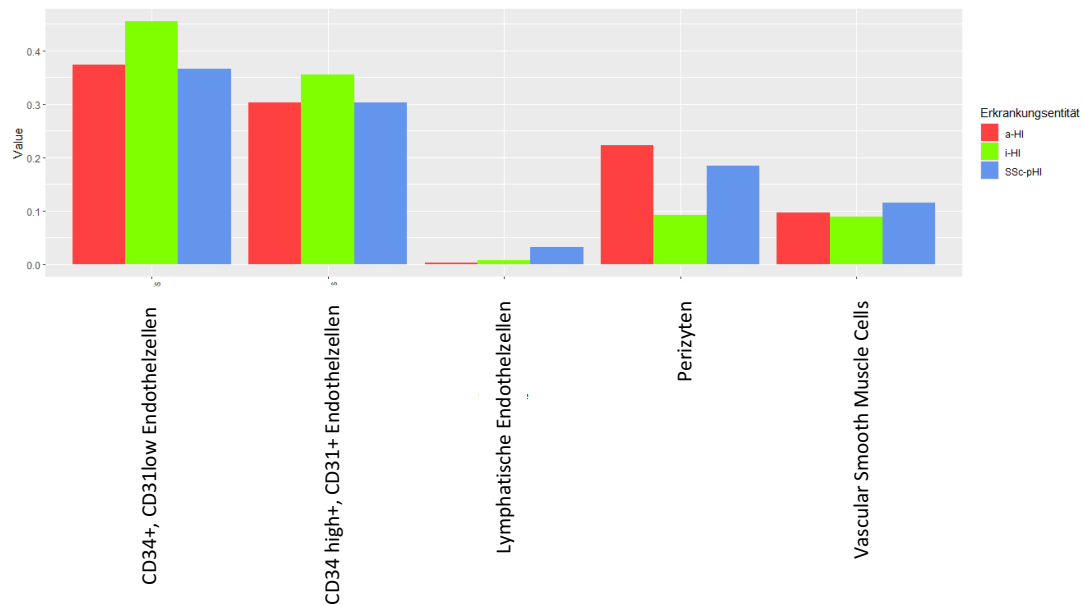


Abb. 29 Häufigkeitsverteilung definierte vaskulärer Zell-Cluster zwischen Krankheitsentitäten: Häufigkeit (in %); **a-HI**, Herzbeteiligung im Rahmen systemischer Autoimmunerkrankungen (nicht SSc), **i-HI**, idiopathische Myokarditis, **SSc-pHI**, primäre Herzbeteiligung im Rahmen einer systemischen Sklerose

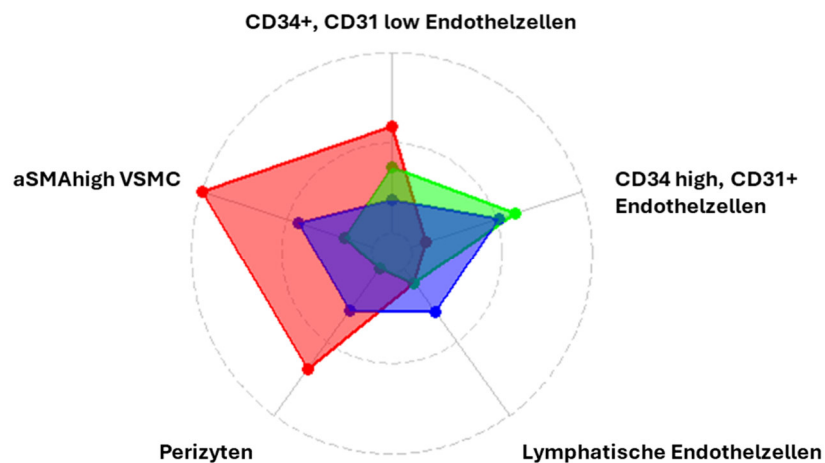


Abb. 30 Radar Chart: Definierte vaskulärer Zell-Cluster vs Krankheitsentität: z-rescaled Daten; Krankheitsentitäten: **a-HI**, Herzbeteiligung im Rahmen systemischer Autoimmunerkrankungen (nicht SSc), **i-HI**, idiopathische Myokarditis, **SSc-pHI**, primäre Herzbeteiligung im Rahmen einer systemischen Sklerose

3.3.5. Patientenspezifische Unterschiede in der Clusterhäufigkeit

Es wurden ausführlich die Unterschiede in der Clusterfrequenz zwischen verschiedenen Krankheitsentitäten beschrieben. Jedoch zeigt sich auch innerhalb einer Krankheitsentität eine relativ große interindividuelle Variabilität zwischen den Patienten. Diese wird in allen betrachteten Zellpopulationen augenscheinlich. (Immunzellen: Abb. 31, Stromazellen: Abb. 32, vaskuläre Zellen: Abb. 33)

Zum Zeitpunkt der Dissertationserstellung lagen die vollständigen klinischen Daten zur Korrelation nicht vor. Diese soll (soweit möglich) in einem Folgeprojekt erfolgen.

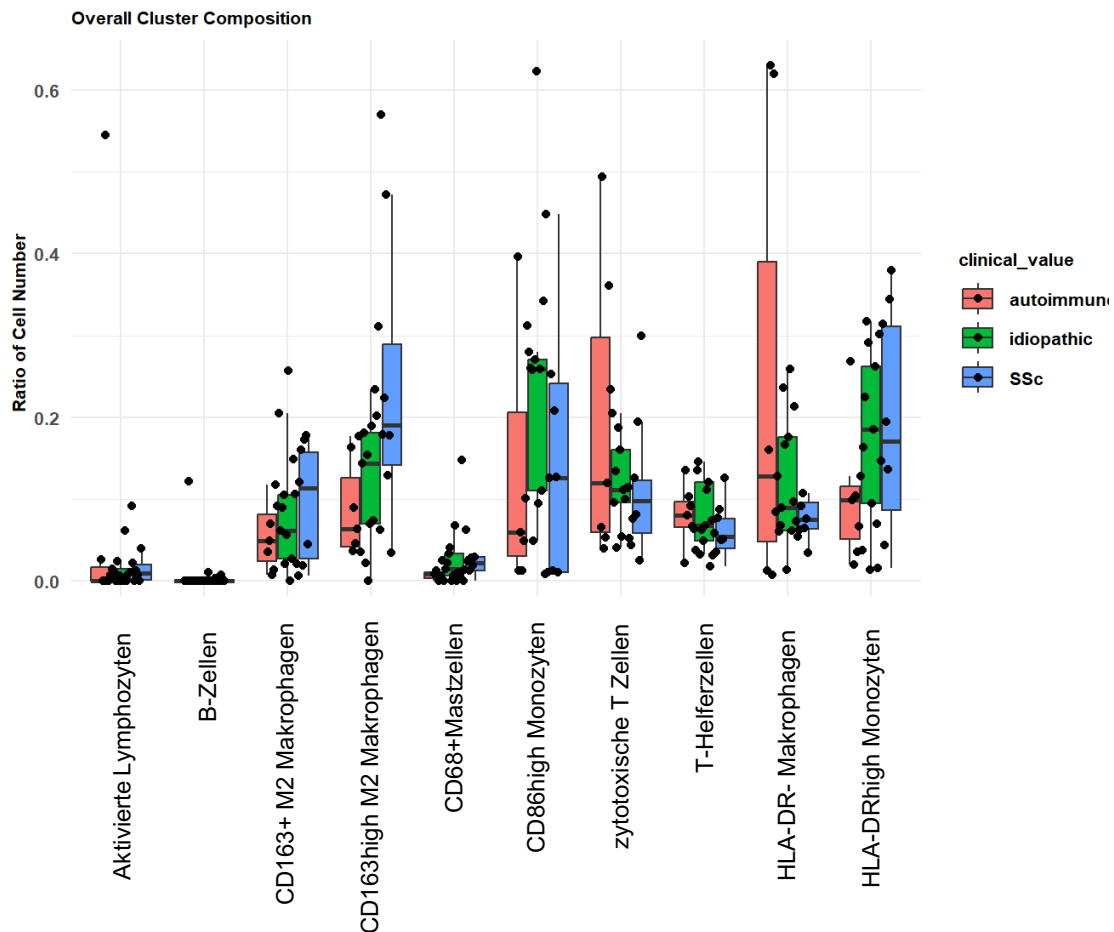
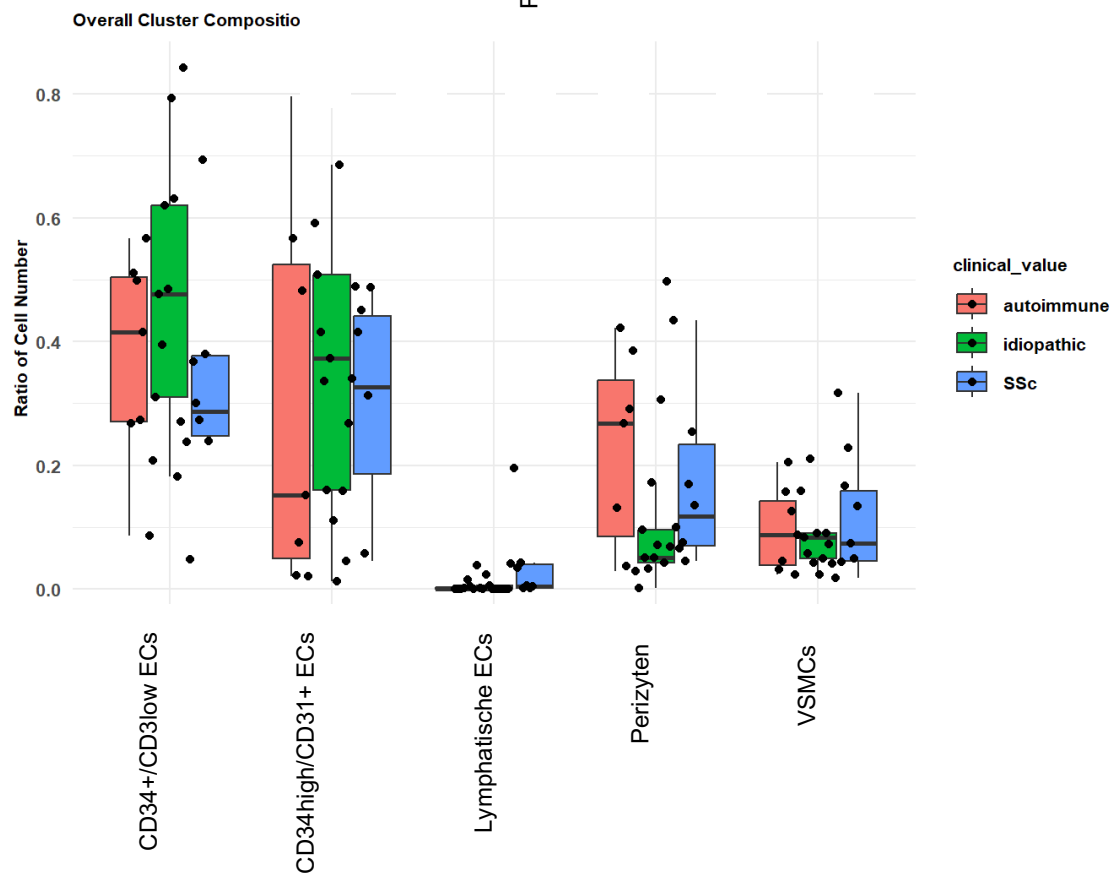
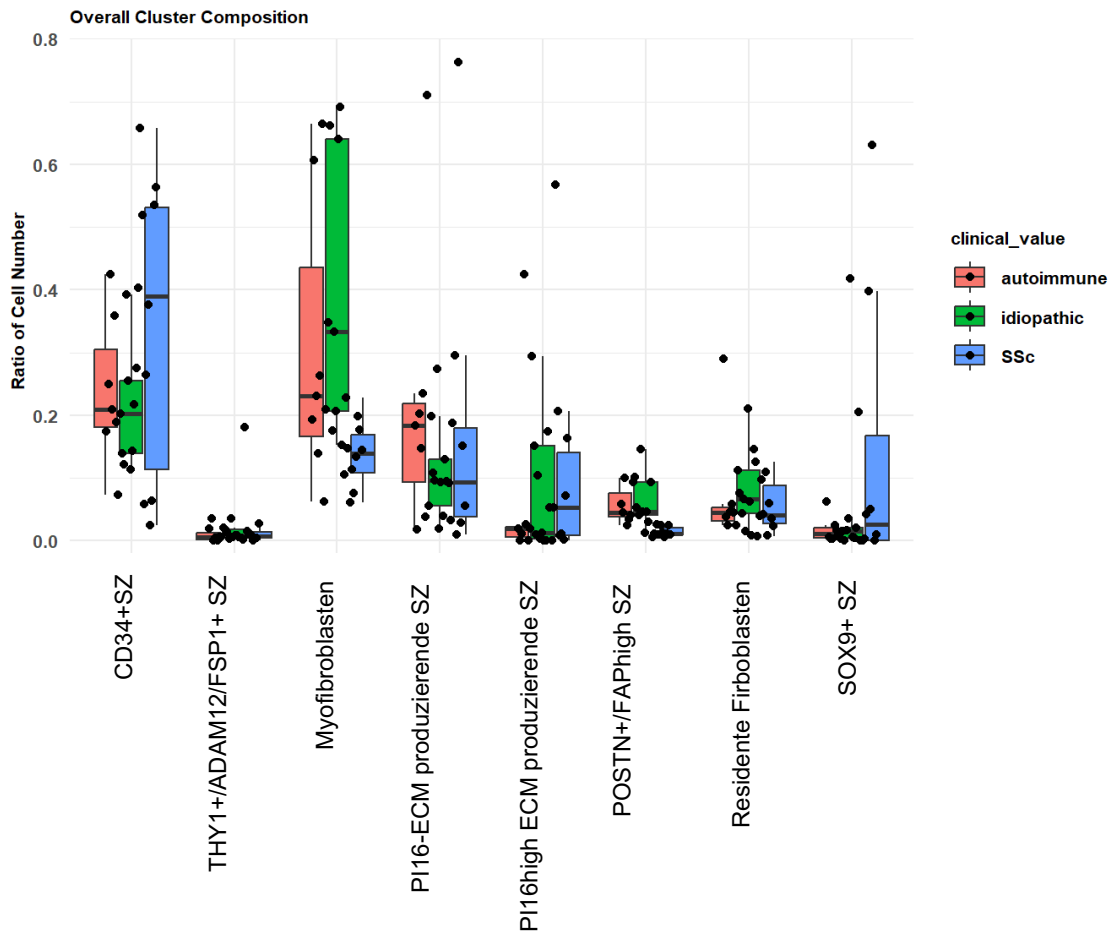


Abb. 31 Patientenspezifische Variabilität in Immunzell-Cluster-Frequenz: Krankheitsentitäten ■: autoimmune, a-HI, Herzbeteiligung im Rahmen systemischer Autoimmunerkrankungen (nicht SSc), ■: idiopathic, i-HI, idiopathische Myokarditis, ■: SSc, SSc-pHI, primäre Herzbeteiligung im Rahmen einer systemischen Sklerose

Abb. 32 (nächste Seite oben): Patientenspezifische Variabilität in Stromazell-Cluster-Frequenz: Krankheitsentitäten ■: autoimmune, a-HI, Herzbeteiligung im Rahmen systemischer Autoimmunerkrankungen (nicht SSc), ■: idiopathic, i-HI, idiopathische Myokarditis, ■: SSc, SSc-pHI, primäre Herzbeteiligung im Rahmen einer systemischen Sklerose; SZ, Stromazellen

Abb. 33 (nächste Seite unten): Patientenspezifische Variabilität in vaskulärer Zell-Cluster-Frequenz: Krankheitsentitäten ■: autoimmune, a-HI, Herzbeteiligung im Rahmen systemischer Autoimmunerkrankungen (nicht SSc), ■: idiopathic, i-HI, idiopathische Myokarditis, ■: SSc, SSc-pHI, primäre Herzbeteiligung im Rahmen einer systemischen Sklerose; EZ, Endothelzellen



4. Diskussion der Ergebnisse

4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse in Hinblick auf die gestellte Forschungsfrage

Giacomo De Luca et al. 2020 haben in der bis dato detailliertesten Charakterisierung von SSc-pHI Myokard (im Vergleich zu a-HI und i-HI) neben klassischen histologischen Färbemethoden (Hämatoxylin-Eosin, Elastika-van-Gieson, Masson-Trichrom und Heidenhain-Trichrom) auch eine immunhistochemische Analyse der Immunzellpopulationen (CD3, CD43, CD45, CD20 und CD68) mittels IF durchgeführt. Bis auf eine ausgeprägtere Fibrosereaktion in der SSc-pHI, die durch Masson-Trichrom quantifiziert wurde, konnten damals keine signifikanten Unterschiede zwischen den Entitäten festgestellt werden. Der zentrale Fortschritt des vorliegenden Projekts liegt in der deutlich detaillierteren Analyse der zellulären Zusammensetzung in den drei wesentlichen Zellpopulationen (Immunzellen, vaskuläre Zellen und Stromazellen), welche durch die IMC Technologie (auf Proteinebene) erstmals ermöglicht wurde.

Wie im Ergebnisteil dargestellt konnten wir erfolgreich demonstrieren, dass sich mittels IMC basierter *Spatial Proteomics* sowohl quantitativ als auch qualitativ eine neue Tiefe in der Analyse der zellulären Zusammensetzung erreichen lässt. Es konnten dabei sowohl in der Immunzell-Population als auch in der Stromazell-Population zelluläre Cluster sowie vorhandene zelluläre Netzwerke identifiziert werden, welche die SSc-pHI (im direkten Vergleich mit a-HI und i-HI) charakterisieren und die besondere Natur der kardialen Fibrose in der Erkrankung, respektive das schlechtere klinische Outcome, möglicherweise mit erklären könnten.

4.2. Limitationen der Studie

Trotz des innovativen Ansatzes und der hohen Relevanz der gewonnenen Erkenntnisse weist die vorliegende Studie mehrere Limitationen auf, die im Kontext der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen:

Studiendesign und Kohortengröße: Die Studie umfasste keine gesunde Kontrollgruppe, was die Vergleichbarkeit und Normalisierung der Ergebnisse erschwerte. EMBs werden aufgrund des Nutzen-Risiko-Verhältnis nur bei sehr hoher klinischer Indikation durchgeführt. Entsprechend ist Biomaterial von Patienten ohne kardiale Symptomatik („Gesunde Patienten“) eigentlich nicht zu bekommen. Material aus Autopsien (mit makroskopisch gesunden Herzen) wurden als Kontrolle aufgrund der unklaren Heterogenität der Kohorte sowie den unabwendbaren kardialen Veränderungen *post mortem* abgelehnt. Ebenfalls schieden aufgrund der immunologischen Natur der SSc-pHI EMBs, welche nach Herztransplantation zur Verlaufskontrolle erfolgt sind, in Folge subklinischer Abstoßungsprozesse und starker immunsuppressiver Vorbehandlung als gesunde Kontrollgruppe aus. Hinsichtlich der vergleichenden Analyse zwischen SSc-pHI, a-HI und i-HI muss somit berücksichtigt

werden, dass es sich in allen drei Fällen um erkranktes kardiales Gewebe handelt. Die Diagnosen wurden allein im klinischen Kontext gestellt. In den durchgeführten konventionellen histopathologischen Untersuchungen zeigt sich ein sehr ähnliches, interindividuell auch innerhalb einer Krankheitsentität variables, Bild aus Kardiomyozyten-Nekrosen, entzündlichen Infiltraten und fibrotischem Gewebeumbau. Im Hinblick auf die Seltenheit der Erkrankungen und die komplexe (und teure) Omics-Analyse, ist die untersuchte Kohorte relativ groß. Allerdings besteht, trotz sorgfältig ausgewählten Biomaterials, klinisch in allen drei Kohorten eine molekulare Heterogenität. Die Natur der i-HI ist zudem unverstanden. In der klinischen Praxis werden sämtliche Formen von Myokarditis ohne erklärende Ursache darunter subsumiert. Dennoch schmälert dies den Wert der explorativen Analyse in Anbetracht der Ergebnisse in unseren Augen nicht wesentlich. Die Verallgemeinerbarkeit der gewonnenen Hypothesen bedarf weiterführender Untersuchungen.

Technologische Einschränkungen: Die Auflösung von $1\mu\text{m}^2$ / Pixel ist gut – liegt jedoch unter der von konventioneller Immunfluoreszenz-Mikroskopie (ca. $0,05\text{-}0,2\mu\text{m}^2$). Mit der Möglichkeit von über 40 Kanälen bietet die IMC, verglichen mit IF oder IHC die Möglichkeit einer deutlich detaillierteren Analyse (auf subzellulärer Ebene) durch die räumliche Analyse werden zudem funktionell relevante Beziehungen zwischen Zellen aufgedeckt. Im Vergleich mit *Spatial Transcriptomics* Analysen, in welcher tausende Transkripte gleichzeitig analysiert werden, sind 40 Marker zwar sehr gering – allerdings ist die biologische Wertigkeit einer Analyse auf Proteinebene stets höher.

Abhängigkeit von bioinformatischen Methoden: Die Interpretation der gewonnenen Daten hängt stark von den verwendeten bioinformatischen Methoden und Analyseansätzen ab. Um Transparenz und Nachvollziehbarkeit zu gewährleisten, wurde der Methodenteil detailliert gestaltet. Es ist jedoch möglich, dass alternative Analyseansätze in zukünftigen Studien auf Basis desselben Datensatzes zu abweichenden Ergebnissen führen. Dieses Phänomen unterstreicht die allgemeine Herausforderung bei der Analyse bioinformatischer Daten, bei der methodenbedingte Unterschiede die Interpretation beeinflussen können.

1. **Segmentationsstrategie und Fokus der Untersuchung:** Der Fokus der Studie lag auf den Nicht-Kardiomyozyten im Myokard. Die hierfür eingesetzte Einzelzellsegmentationsstrategie erwies sich in diesem Kontext als ausreichend, zeigte jedoch Schwächen bei der Segmentierung des Kardiomyozyten-Zytoplasmas. Sollte in zukünftigen Studien ein Schwerpunkt auf Kardiomyozyten gelegt werden, wären methodische Anpassungen notwendig.
2. **Unsupervised Annotation und maschinelles Lernen:** Das Clustering der Daten wurde weitgehend durch unbeaufsichtigte Methoden des maschinellen Lernens durchgeführt. Trotz der Fortschritte in der künstlichen Intelligenz erfordert die Analyse weiterhin menschliche Kontrolle und Interpretation, insbesondere bei der Festlegung von Parametern und der Bewertung der biologischen Plausibilität der Ergebnisse. Diese Schritte bergen das Risiko potenzieller Verzerrungen und

Fehlinterpretationen, sind jedoch unerlässlich, um die Validität der Ergebnisse sicherzustellen.

3. **Kritische Überprüfung der Ergebnisse:** Die Interpretation der Ergebnisse wurde durch umfassende Literaturrecherche, Teamdiskussionen und die Anwendung des Prinzips der Mehr-Augen-Prüfung abgesichert. Dennoch bleiben Unsicherheiten bestehen, da die biologische Plausibilität der Ergebnisse nicht in allen Fällen abschließend validiert werden konnte.

Diese Limitationen zeigen die Komplexität und Herausforderungen der Untersuchung auf, betonen jedoch auch die Notwendigkeit einer kritischen Reflexion der angewandten Ansätze und der gewonnenen Erkenntnisse, um die Validität zukünftiger Forschung zu stärken.

4.3. Wissenschaftliche Diskussion der Ergebnisse

4.3.1. Immunzellen in der SSc-pHI (im Vergleich zur a-HI)

4.3.1.1. Zusammenfassende Übersicht: Immunzellen in SSc-pHI

In bisherigen Publikationen sind keine Besonderheiten in den myokardialen Immunzellen in der SSc-pHI beschrieben worden. Die Gesamtzahl an CD45⁺ Immunzellen zwischen den Krankheitsentitäten (SSc-pHI vs. a-HI/i-HI) variiert nur unwesentlich. Unsere Untersuchung mittels IMC konnte erstmal zeigen, dass in der SSc-pHI – obgleich die SSc ebenfalls als Autoimmunerkrankung dem Formenkreis der Kollagenosen zugerechnet wird – verglichen mit anderen systemischen Autoimmunerkrankungen/Kollagenosen (a-HI), relevante Unterschiede in der Immunzellkomposition im Myokard bestehen. Während in der a-HI (aktivierte) lymphozytäre Immunzellen dominieren, wird die SSc-pHI insbesondere durch eine hohe Frequenz an M2 Makrophagen, insbesondere CD163^{high}/HLA-DR⁺M2 Makrophagen aber auch CD163⁺/HLA-DR⁺M2 Makrophagen charakterisiert. Desweiteren wurden gehäuft HLA-DR^{high} Monozyten sowie CD68⁺Mastzellen in der SSc-pHI nachgewiesen.

4.3.1.2. CD163⁺ M2 Makrophagen

4.3.1.2.1. Einführung in die Biologie der (M2) Makrophagen

Die heterogene Rolle von Makrophagen sowohl in der Gewebemöostase als auch im Kontext von Erkrankungen ist in den letzten Jahren verstärkt in den Fokus des Interesses gerückt. Makrophagen spielen als erste Verteidigungslinie des angeborenen Immunsystems gegen Mikroorganismen im Gewebe eine wichtige Rolle. Daneben sind sie jedoch auch unter physiologischen Bedingungen maßgeblich für den Erhalt der Gewebemöostase verantwortlich.

Die Rolle von verschiedenen Makrophagen-Subpopulationen ist divers – teilweise auch gegensätzlich; so spielen, historisch als (klassisch aktivierte) Makrophagen vom M1 Typ bezeichnete Immuneffektorzellen mit einem akut inflammatorischen Phänotyp, im Kontext von Inflamationsreaktionen aber auch in der Abwehr von

Tumorerkrankungen eine wichtige Rolle. So genannte alternativ aktivierte Makrophagen M2 Typ sind hingegen maßgeblich an der Resolution von Entzündung und anschließender Wundheilungsreaktion aber auch bei fibrotischem ECM Remodeling beteiligt. Inzwischen sind verschiedene M1/M2 Subpopulationen mit jeweils höchst spezifischen Eigenschaften identifiziert worden.

Neben allgemeinen Funktionen (z.B. Phagozytose) zeigen Makrophagen eine ausgeprägte Anpassung an das Zielgewebe und übernehmen in diesem auch gewebespezifischen Aufgaben. Im Herzen scheinen Makrophagen u.a. beteiligt an der Aufrechterhaltung von Integrität und Tonus der Blutgefäße, Angiogenese sowie an der elektrischen Signalübertragung zwischen Kardiomyozyten.¹⁶⁹ Erkenntnisse aus scRNA-Seq und *lineage tracing* Untersuchungen haben das historisch gewachsene Bild von M1- vs. M2-Makrophagen erweitert. Tatsächlich scheint die Herkunft der Makrophagen eine wichtige Rolle zu spielen. So gibt es in einem Gewebe grundlegende funktionelle Unterschiede zwischen gewebeständigen Makrophagen, die aus einem, während der Embryonalzeit eingewanderten, Pool von Vorläuferzellen stammen und Monozyten-abgeleiteten Makrophagen. Erstere sind optimal an das Zielgewebe adaptiert und fungieren quasi als *gatekeeper* der Gewebemöostase, während sich Letztere differenzieren aus Monozyten, welche durch inflammatorische Stimuli in das Zielgewebe gelockt wurden – sie sind weniger gut an die gewebespezifischen Anforderungen angepasst und werden durch das pathologische Mikromilieu der Erkrankung zusätzlich in eine dysfunktionale Richtung getrieben in welchem sie den pathologischen Zustand (z.B. chronische Entzündung, Fibrose) aufrechterhalten.¹⁷⁰ So konnte eine Assoziation zwischen der Akkumulation von Monozyten-abgeleiteten Makrophagen und der Fibrosereaktion im geschädigten Myokard nachgewiesen werden.¹⁷¹ Für gewebeständige kardiale Makrophagen konnte hingegen ein Schutz vor Fibroseinduktion sowie die Stimulation von Angiogenese im Myokard gezeigt werden.¹⁷²

Im Herzen wurde die Rolle von Makrophagen bereits bei verschiedensten Erkrankungen u.a. KHK/Atherosklerose, Myokarditis, Myokardinfarkt, *cardiac aging* oder Herzinsuffizienz untersucht. Die funktionelle Ausrichtung von Makrophagen, auch als Polarisierung bekannt, ist ein komplexer Prozess, der durch unterschiedliche Signalwege, mediert u.a. durch Zytokine, sowie epigenetische und post-transkriptionelle Regulation gesteuert wird.¹⁷³

In der SSc sind Makrophagen sowie die Makrophagen-Fibroblasten Interaktion u.a. in der Haut und in der Lunge (nicht jedoch spezifisch in kardialen Gewebe) untersucht worden.¹⁷⁴

4.3.1.2.1. CD163⁺ M2-Makrophagen in SSc und anderen fibrotischen Erkrankungen

CD163⁺ Makrophagen stellen eine Subpopulation von Makrophagen dar, welche für gewöhnlich dem M2-Typ Spektrum zugerechnet werden. Für gewöhnlich werden Makrophagen vom M2a und M2c Makrophagen durch die CD163 Expression charakterisiert. Eine vollständige Zuteilung der identifizierten Makrophagen-Cluster ist

mit den im Panel inkludierten Markern nicht möglich. (M2a Makrophagen unterscheiden sich von M2c Makrophagen u.a. durch eine relevanten MHC-II Expression). Alle CD163⁺ Makrophagen sind an der Auflösung von Entzündung, der Gewebereparatur sowie (im pathologischen Kontext) am fibrotischen Geweberemodeling beteiligt.¹⁷⁵ CD163 ist ein *Scavenger* Rezeptor, der u.a. Hämoglobin/Haptoglobin Komplexe sowie *Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis* (TWEAK) sowie verschiedene Oberflächenstrukturen von Pathogenen binden kann. Neben der membrangebundenen Form gibt es auch eine lösliche Form, welche nach proteolytischer Abspaltung der Transmembrandomäne im Blut nachgewiesen werden kann.¹⁷⁶ Einige Studien untersuchten die lösliche Form von CD163 in Serum und konnten eine signifikante Erhöhung des Markers in SSc Patienten (verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe) finden.¹⁷⁷ Im Gewebe ist die Relevanz von CD163⁺ Makrophagen in der SSc bislang hingegen unzureichend untersucht. Untersuchungen aus anderen fibrotischen Erkrankungen geben Hinweis darauf, dass CD163⁺ Makrophagen in einem bidirektionalen Austausch mit Stromazellen stehen und auf diese Weise die fibrotische Gewebeantwort maßgeblich mit modulieren. Dabei konnte in vitro sowohl gezeigt werden, dass SSc Fibroblasten die Aktivierung von CD163⁺ Makrophagen (via *extracellular-signal regulated kinases 1/2* (ERK1/2)) induzieren können¹⁷⁸, als auch umgekehrt mit CD163⁺ Makrophagen co-kultivierte Fibroblasten in Richtung eines profibrotischen Phänotyps verändern können¹⁷⁹.

So konnte u.a. in COVID assoziierter Lungenfibrose eine Akkumulation von CD163⁺ (Monozyten abgeleiteten) Makrophagen im Lungengewebe gefunden werden.¹⁸⁰ Ebenfalls wurde eine Kolo-kalisation von CD163⁺ Makrophagen mit Myofibroblasten und Kollagen-Foki in Herzen post-COVID Infektion nachgewiesen.¹⁸¹ Auch in der idiopathischen Lungenfibrose¹⁷⁷ sowie in der IgG4 assoziierten Fibrose¹⁸² lassen sich vermehrt CD163⁺ Makrophagen im Gewebe finden.

Eine Interessante Untersuchung zur Rolle von CD163⁺ Makrophagen in der kardialen Fibrose wurde von Nakayama et al. 2017 durchgeführt.¹⁸³ In dieser wurden EMBs von 182 Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie mittels IHC untersucht (und neben anderen Faktoren) mit dem klinischen Verlauf korreliert. Eine *multivariate Cox proportion hazard regression* Analyse zeigte dabei, dass lediglich eine hohe Zahl an CD163⁺ Zellen als prädiktiver Faktor für ein schlechtes klinisches Outcome darstellte. In der zusätzlich durchgeführten *Collagen area fraction* Analyse (mittels Massons Trichrom Quantifizierung) konnten in einer *multivariate linear regression* Analyse erneut spezifisch die Zahl an CD163⁺ Zellen im Gewebe als unabhängige Determinante für die Kollagen Akkumulation festgestellt werden.

4.3.1.2.1 CD163⁺ Makrophagen in der SSc-pHI

Es gibt keine Voruntersuchungen, in welcher CD163⁺ Makrophagen im Myokard von SSc-pHI gezielt untersucht wurde. Die Ergebnisse der hier durchgeführten IMC-Analyse in der SSc-pHI demonstrieren, dass im Vergleich zu anderen autoimmunen

Herzbeteiligungen mit lymphozytär-dominierten Immunzellinfiltraten, in der SSc-pHI die Zahl der CD163⁺ Makrophagen hochreguliert ist. Es konnten zwei distinkte Cluster identifiziert werden, CD163^{high}HLA-DR⁺ und CD163⁺HLA-DR⁻ Makrophagen – beide waren mit der SSc-pHI assoziiert.

Die spezifische Interaktion zwischen Fibroblasten und CD163⁺/CD163^{high} Makrophagen in der SSc-pHI, in Hinsicht auf die fibrotische Reaktion im Myokard, soll in einem Folgeprojekt näher charakterisiert werden.

Grundsätzlich stellen CD163⁺ M2 Makrophagen auch aus translationaler Sicht sowohl für diagnostische Applikation (z.B. innovative PET Bildgebung) sowie für therapeutische Interventionen ein interessantes neues Target da.

4.3.1.3. (CD68⁺) Mastzellen

4.3.1.3.1. Einführung in die Biologie der Mastzellen

Mastzellen sind gewebeständige Immunzellen, myeloider Herkunft, welche sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunantwort in allen Phasen mitprägen. In ihrer Funktion und Mediatorzusammensetzung gibt es gewebespezifische Unterschiede. Insbesondere an Haut- und Schleimhautbarrieren, die als Schnittstellen zur Umwelt dienen, übernehmen Mastzellen eine wichtige Rolle in der *immune surveillance*. Mastzellen werden unter anderem durch Rezeptoren für Immunglobulin E, CD117 (c-Kit), Toll-like Rezeptoren sowie Komplementfaktoren aktiviert. Histologisch zeichnen sie sich durch ihre zytoplasmatischen Granula aus, die unter anderem Histamin, Tryptase (TPSAB1), Chymase, Heparin und Serotonin enthalten. Diese Mediatoren wirken nicht nur proinflammatorisch, sondern Regulieren z.B. auch die Gefäßpermeabilität mit.¹⁸⁴

Lange Zeit wurde die biologische Bedeutung von Mastzellen auf die Abwehr parasitärer Erreger z.B. Würmer, sowie im pathologischen Kontext auf allergische Typ-I-Hypersensitivitätsreaktionen (und assoziierte Erkrankungen z.B. Asthma bronchiale) beschränkt. In den letzten Jahren haben sich jedoch die Hinweise darauf gehäuft, dass der Einfluss von Mastzellen weit darüber hinaus reicht. So wurde eine Beteiligung von Mastzellen im Kontext von Gewebereparatur und Fibrose in verschiedenen Organen beschrieben (u.a. Haut¹⁸⁵, Niere¹⁸⁶ und Herz¹⁸⁷).¹⁸⁸ Auch in der Tumor-Umgebung scheinen Mastzellen von Bedeutung zu sein.¹⁸⁹

4.3.1.3.2. Mastzellen in SSc und anderen fibrotischen Erkrankungen

Mastzellen scheinen die inflammatorische Umgebung, welche zur Entwicklung und Aufrechterhaltung von Fibrose beiträgt, u.a. durch Sekretion von inflammatorischen und profibrotischen Mediatoren (z.B. Tryptase, TGF-β), wesentlich mitzuprägen. Jedoch scheint auch der direkte Zell-Zell Kontakt zwischen Mastzellen und Fibroblasten wichtig zu sein; dieser scheint u.a. durch *Plasminogen activator inhibitor type 1* sowie *cell adhesion molecule-1* vermittelt zu werden.^{190,191} Da jedoch auch Studien existieren, die einen antifibrotischen Effekt von Mastzellen beschreiben, scheint die Regulation im Detail komplex zu sein.^{191,192} Die dichotome Rolle der Mastzellen wurde auch im Herzen untersucht.^{187,193}

In der SSc konnten Mastzellen in signifikant erhöhter Zahl in betroffenen Geweben z.B. Haut (im Vergleich zu noch nicht betroffenen Arealen des gleichen Patienten), in der Frühphase der Erkrankung festgestellt werden.¹⁹⁴ Im Vergleich zu Gesunden war die Gesamtzahl an Mastzellen sowie die Zahl degranulierter Mastzellen (auch in nicht betroffenen Hautarealen) erhöht, sowohl in der frühen Phase der Erkrankung als auch in der Spätphase.¹⁹⁵ Das fibrogene Potenzial vieler u.a. von Mastzellen freigesetzter Mediatoren z.B. *platelet-activating factor*, TGF- β , PDGF oder Fibronectin wurde in der SSc ausführlich untersucht.¹⁹⁶ Direkter Zell-Zell Kontakt via *gap junctions* scheint für den Einfluss von Mastzellen auf die Fibroblasten und die Fibrosereaktion in der SSc jedoch ebenfalls von Bedeutung zu sein.¹⁹⁷ Diese Ergebnisse werden auch von klinischer Beobachtung gestützt – so klagten viele SSc Patienten noch vor einem sicht-/messbaren Progress der Hautbeteiligung über Pruritus. Ein typisches Symptom, welches durch Mastzell-Mediatoren (u.a. Histamin) verursacht wird. Auch die ödematöse Frühphase der Hautbeteiligung („puffy hands“), welche durch Inflammation und vaskulärer Leckage verursacht wird, ähnelt stark anderen Mastzell-vermittelten Phänomenen. Tatsächlich wurden im Blut einer Kohorte von SSc Patienten bei 56% (davon 74% dcSSc) erhöhte Histamin Spiegel gemessen.¹⁹⁸ Der Einfluss von Mastzellen auf die SSc-Vaskulopathie ist bis dato nicht dezidiert untersucht worden. In den letzten Jahren ist der Beitrag von Mastzellen zur Pathophysiologie der SSc weitgehend in Vergessenheit geraten.

4.3.1.3.3. (CD68⁺) Mastzellen in der SSc-pHI

Es gibt keine Voruntersuchungen in welcher Mastzellen im Myokard von SSc-pHI gezielt untersucht wurden. In unserer Untersuchung stellte sich eine klar separierte Population an CD68⁺/TPSAB1⁺(/THY1⁺) Mastzellen dar.

CD68⁺ Mastzellen wurden bis dato lediglich im Kontext von Tumorerkrankungen, genauer Kolorektalem Karzinom, beschrieben.¹⁹⁹ Ein spill-over Effekt wurde ausgeschlossen. Die Kontrolle im Bild bestätigte die Co-Expression im identifizierten Cluster. Eine Bestätigung des Clusters mittels ergänzender Methode z.B. IF ist geplant.

Das Mastzell-Cluster präsentierte sich in der SSc-pHI im Vergleich zu den anderen beiden Entitäten von der Tendenz her hochreguliert – obgleich mit der untersuchten Kohorte keine Signifikanz erreicht wurde. Dieses Ergebnis belegt, dass die Rolle der Mastzellen in der SSc-(pHI), auch aus translationaler Sicht, neue Aufmerksamkeit verdient hat.

4.3.2. Stromazellen in der SSc-pHI (im Vergleich zur a-HI)

4.3.2.1. Zusammenfassende Übersicht: Stromazellen in SSc-pHI

Stromazellen im Myokard von SSc-pHI wurden bis dato noch nicht im Detail untersucht. In anderen fibrotischen Herzerkrankungen wurde die kardiale Fibroblasten-Population, aufgrund der hohen Relevanz, bereits mit verschiedenen Methoden (unseres Wissens jedoch nicht IMC) versucht näher zu charakterisieren.

Grundsätzlich zeigte sich prozentual eine deutliche Expansion der Stromazell-Population in der SSc-pHI, verglichen zu den anderen beiden Krankheitsentitäten. Es konnten insgesamt 8 definierte Stromazell-Cluster identifiziert werden. Während in der a-HI insbesondere Myofibroblasten, sowie FAP^{high}/POSTN⁺ Stromazellen relativ gesehen die Stromazellpopulation dominierten, stellten sich in der SSc-pH (im Vergleich zu den anderen beiden Entitäten) insbesondere CD34⁺ Stromazellen sowie PI16⁺ ECM produzierende Zellen (COL1A1^{high}, POSTN⁺) des Weiteren SOX9⁺ Stromazellen und THY1⁺/ ADAM12⁺/ FSP1⁺ Stromazellen hochreguliert dar. Mittels Massons Trichrome Färbung konnte in der SSc-pHI Kohorte zuvor ein höherer Fibrose-Score (im Vergleich zur a-HI und i-HI Kohorte) detektiert werden.²⁰⁰

4.3.2.2. Myofibroblasten

4.3.2.2.1. Einführung in das Konzept der Myofibroblasten und kritische Bewertung

Das Konzept des Myofibroblasten als Schlüsselzelle im Kontext von fibrotischen Reaktionen wurde vor über 50 Jahren auf der Basis von *in vitro* Experimenten erstellt. Myofibroblasten stellen demnach eine (durch fibrotische Stimuli) aktivierte Form von ruhenden Fibroblasten dar, welche sich durch eine gesteigerte Produktion von ECM (insbesondere COL1A1) sowie kontraktilen Eigenschaften (vermittelt über α -SMA in Stressfasern) auszeichnen.²⁰¹

Die Fortschritte in der Charakterisierung der Stromazell-Population mittels scRNASeq und Omics- Analysen, welche in den letzten Jahren zunehmend auch *in vivo* durchgeführt wurden, kamen allesamt v.a. zu einer Erkenntnis: Die Heterogenität innerhalb der Fibroblasten Population – sowohl zwischen verschiedenen Geweben, als auch innerhalb eines Gewebes bzw. unterschiedlicher pathologischer Zustände eines bestimmten Gewebes – ist enorm.^{202,203} Untersuchungen *in vitro* können die Komplexität *in vivo* nur rudimentär erfassen. Insbesondere, da sich Fibroblasten unter artifiziellen Kulturbedingungen verändern und sogar allein durch die Kultur auf steifem Plastik unabhängig von profibrotischen Zytokinen einen *myofibroblast-like* Phänotyp annehmen können.^{204,205}

Die Fibroblasten Heterogenität *in vivo* ist bis dato nur rudimentär verstanden – deutet jedoch auf eine sehr hohe Spezialisierung der Zellen hin. Mit diesem Hintergrund wird das Konzept des monomorphen Myofibroblasten als Schlüsselzelle in der Fibrose, welcher alleine verantwortlich ist für die Orchestrierung der Fibrosereaktion u.a. ECM-Produktion, Gewebekontraktion, Sekretion von profibrotischen Zytokinen sowie Interaktion mit Nachbarzellen, zunehmend unglaubwürdig. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass es neben den klassischen α -SMA⁺ Myofibroblasten, durchaus α -SMA negative Fibroblasten-Subpopulationen gibt, welche eine höhere COL1A1 Expression aufweisen. So konnte eine Studie von Sun *et al.* 2016 mittels dualem Reporter-Maus-System - in welchem Kollagen-produzierende Zellen mit grünem Fluoreszenzfarbstoff und α -SMA-produzierende Zellen mit rotem Fluoreszenzfarbstoff markiert waren- zeigen, dass viele Kollagen-produzierenden Zellen tatsächlich *in vivo* α -SMA negativ waren (und damit nicht dem Phänotyp eines klassischen Myofibroblasten entsprachen).

Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die α -SMA negative Fibroblasten in gleichem Maße zur TGF- β Aktivierung beitragen, wie die α -SMA positiven Fibroblasten.²⁰⁶

Aus der Erkenntnis, dass α -SMA-positive Myofibroblasten eine zentrale Rolle in der Wundheilung spielen und fibrotische Reaktionen auslösen können, lässt sich nicht ableiten, dass Wundheilung oder Fibrose ausschließlich in Anwesenheit von α -SMA-positiven Myofibroblasten möglich sind – dieser Fehlschluss der Umkehrung wird jedoch im Kontext von Fibrose und Myofibroblasten häufig gemacht.

Dachte man anfangs, dass Myofibroblasten terminal differenzierte Zellen darstellen, so gilt diese Annahme heute als widerlegt. Fibroblasten zeigen eine erstaunliche Plastizität und sind, je nach Umweltbedingungen und Signalen, in der Lage sich kontinuierlich, dynamisch zu verändern. Es sind dabei fließende Übergänge zwischen verschiedenen (Aktivitäts-)Zuständen eines Fibroblasten erkennbar, die u.a. durch spezifische molekulare Marker und funktionelle Eigenschaften charakterisiert werden können.²⁰⁷ Der klassische Myofibroblast stellt einen von vielen möglichen (funktionellen) Aktivitätszuständen dar. Aktivierte Fibroblasten entstammen dabei keineswegs lediglich aus einem ruhenden Fibroblasten-Pool, sondern können sich auch aus anderen Zellen trans-differenzieren.

Wir regen daher an, den bisherigen Fokus auf Myofibroblasten als Schlüsselzellen der Fibrose zu erweitern und anstelle der binären Theorie von ruhenden Fibroblasten und aktivierten Myofibroblasten, ein heterogenes und dynamisches Spektrum von (aktivierten) Fibroblasten sowohl im physiologischen „Ruhezustand“ als auch im Zentrum von Wundheilung/ Fibrosereaktion in Betracht zu ziehen.

4.3.2.2.2. Versuch einer neuen Einordnung von Myofibroblasten in SSc und anderen fibrotischen Erkrankungen

Eine sehr interessante Studie wurde von *Liu et al. 2007* in diesem Zusammenhang in einem Bleomycin-Mausmodell für pulmonale Fibrose beobachtet, nachdem ein Zusammenhang zwischen der *Mitogen-activated protein kinase 2* (MK2) und der Myofibroblasten Differenzierung und Regulation *in vitro* beschrieben wurde. Wurden (MK2/MK2-) *knockout*-Mäuse mit Bleomycin behandelt zeigten sie eine stärkere pulmonale Fibrosereaktion als der Wildtyp – mit mehr Fibroblasten- und COL1A1 Akkumulation – obwohl sich kaum α -SMA⁺ Myofibroblasten im Gewebe der *knockout* Mäuse befanden.²⁰⁸ Diese Beobachtung stellt die Sicht auf α -SMA⁺ Myofibroblasten auf den Kopf.

Tatsächlich beschreibt auch eine andere Studie von *Russo et al. 2020* einen protektiven Effekt von aktivierten α -SMA⁺ Myofibroblasten im Myokard in einem *transverse aortic constriction* Mausmodell. Ein Myofibroblasten-spezifischer Smad 3 (=Mothers against decapentaplegic homolog 3) *knockout* führte interessanterweise nicht zur Verbesserung, sondern zur klinischen Verschlechterung mit einer Zunahme des fibrotischen Umbaus sowie Makrophagen-getriebener Inflammation im Myokard. Als eine mögliche

Erklärung für den Fibrose-protectiven Effekt der Myofibroblasten wurde die Smad 3 abhängige Suppression von Matrix-degradierenden Proteasen postuliert.²⁰⁹

Diese Beispiele verdeutlichen noch einmal mehr, wie diffizil die physiologische Wundheilungsreaktion gesteuert werden muss. Die Aktivierung von Fibroblasten durch einen (z.B. entzündlichen) Schaden ist *per se* zunächst einmal eine erwünschte und unerlässliche Reaktion. Der Verlauf der Gewebeantwort wird in allen Phasen durch die Komposition und dynamische Natur verschiedener Fibroblasten-Subpopulationen geprägt und orchestriert. Dabei hat jede Phase der physiologischen Wundheilungsreaktion sehr spezifische Anforderungen an die Stromazell-Population.

So stellen α -SMA⁺ Myofibroblasten *in vivo* zunächst einmal einen in erster Linie reparativen als primär-fibrotischen Aktivitätszustand aktivierter Fibroblasten dar. Die eigentliche fibrotische Reaktion *in vivo* kann daher durch eine pathologische Aktivierung/Persistenz von aktivierten Myofibroblasten oder anderer Fibroblasten-Subpopulationen mit profibrotischer Potenz, verursacht werden - die α -SMA-Expression *in vivo* kann dabei nicht als entscheidender Marker betrachtet werden, da es in erster Linie Kontraktilität vermittelt.

Das Konzept der α -SMA⁺ Myofibroblasten als zentrale Schlüsselzelle für die Fibrose Reaktion *in vivo* muss heutzutage als obsolet betrachtet werden, obgleich es scheinbar große Widerstände in der wissenschaftlichen Gemeinschaft gibt dies anzuerkennen. Vielmehr scheint ein heterogenes Spektrum aus aktivierten Stromazellen (darunter auch klassische α -SMA⁺ Myofibroblasten) die individuelle Fibrosereaktion zu prägen.

Insbesondere im Herzen zeigte sich z.B. die POSTN Expression in Fibroblasten hauptsächlich in Bereichen mit Gewebeschädigung.²¹⁰ Aus diesem Grund sind POSTN⁺ aktivierte Fibroblasten Populationen auch im Kontext von myokardialer Fibrose von Interesse.

4.3.2.2.3 POSTN⁺ Fibroblasten Subsets.

POSTN wird in physiologischem Ruhezustand von kardialen Fibroblasten wenig exprimiert und erst auf eine schädigende Stimulation z.B. Inflammation in der Expression während der aktiven Phase des Geweberemodelings hochreguliert und stellt damit einen etablierten Marker für (einen Teil)der aktivierten Fibroblasten im Herzen dar. POSTN wird, dabei zwar ähnlich wie Kollagen in die ECM sezerniert, stellt selbst jedoch kein klassisches ECM-Strukturprotein dar, sondern hat im Wesentlichen eine regulatorische Funktion. POSTN bindet extrazellulär u.a. an Kollagen oder Fibronektin und hat hierüber einen mechanisch-stabilisierenden Effekt auf die ECM u.a. durch Förderung der Kollagenquervernetzung und damit Stabilität der ECM. Über Bindung an Integrine ist POSTN zudem an der Mechanotransduktion (Mechanosignaling) beteiligt.²¹¹ Auf diese Weise ist POSTN an der Aktivierung von Fibroblasten im Gewebeumbau oder in Fibrose beteiligt. Im mechanisch beanspruchten Gewebe z.B. Myokard spielt POSTN eine besondere Rolle bei der Adaption der ECM auf veränderte mechanische Kräfte.

In dem vorliegenden Datensatz konnten drei verschiedenen POSTN⁺Fibroblasten Subsets identifiziert werden: FAP⁺/POSTN⁺ Fibroblasten, COL1A1^{high}/POSTN⁺/PI16^{high} sowie COL1A1⁺/ POSTN⁺/ PI16⁻ (ECM produzierende) Fibroblasten.

Die gezielte Elimination von POSTN in Tamoxifen induzierbaren Cre- transgenen Mäusen schien im gesunden Herzen keine Auswirkungen zu haben, führte jedoch unter Belastung z.B. nach chronischer Angiotensin-II-Exposition oder nach einem Myokardinfarkt zu einer geringeren Fibrosebildung und verbesserter Herzfunktion. (ohne die Narbenstabilität zu beeinträchtigen).²¹²

4.3.2.3. FAP⁺ Fibroblasten

4.3.2.3.1. Hintergrund: FAP⁺ Fibroblasten

Nachdem die nicht-klassische Serinprotease FAP in den 1990ern erstmals u.a. im Kontext von tumorassoziierten Fibroblasten sowie im Kontext von Gewebeumbau im Allgemeinen beschrieben wurde^{213,214}, kam es in den letzten 25 Jahren, durch die erfolgreiche Anwendung und Entwicklung von FAPI (FAP Inhibitor) basierter PET Bildgebung in verschiedenen onkologischen und entzündlich/fibrotischen Erkrankungen zu einem neuen Hype um FAP⁺ Fibroblasten. In verschiedenen soliden Malignom-Erkrankungen wurde der Nachweis von viel FAP⁺ Fibroblasten in der Tumormikroumgebung (mittels ⁶⁸Ga-FAPI-04 PET-CT) als prognostisch ungünstiges Merkmal herausgestellt.²¹⁵ In der Rheumatologie wurde die diagnostische Anwendung von ⁶⁸Ga-FAPI-04 PET-CT u.a. in der SSc-ILD²¹⁶ sowie SSc-pHI²¹⁷ demonstriert. In diesem Kontext wurde das FAPI Signal als Fibroblasten-Aktivierung gedeutet. Tatsächlich korrelierte das Ergebnis der PET Bildgebung in der Lunge mit fibrotischer Aktivität und Progress der Erkrankung. Auch eine Reduktion des FAPI Signals unter Therapie mit Nintedanib konnte gezeigt werden.²¹⁶ Damit stellen FAP⁺ Fibroblasten tatsächlich eine interessante Stromazell-Subpopulation im Kontext von Fibrose dar. Aus diesem Grund ist es nicht verwunderlich, dass auch erste (erfolgreiche) therapeutische Versuche im Tiermodell unternommen wurden diese, offensichtlich pathophysiologisch relevante Zellpopulation, gezielt zu eliminieren z.B. mittels FAP-CAR.T-Zellen in einem Mausmodell für myokardiale Fibrose.^{192,218}

4.3.2.3.2. Kritische Einordnung von FAP⁺ Fibroblasten im Kontext von Inflammation/Fibrose

Die spezifische pathophysiologische Bedeutung der FAP⁺ Fibroblasten Population ist strenggenommen jedoch bis dato nur rudimentär verstanden. Im adulten Organismus scheint die FAP Expression in Fibroblasten primär im Rahmen von physiologischen oder pathologischen Gewebeumbau Prozessen hochreguliert zu werden. In der Fibrose scheinen u.a. FAP⁺ Fibroblasten die „aktive Phase“ der Erkrankung zu vermitteln, d.h. sie sind Ausdruck aktiven *remodelings* (reparativer oder fibrotischer Art). In einem gesunden *steady state* ist FAP auf Fibroblasten entweder nicht oder nur in sehr geringen Mengen exprimiert. In einem Gewebe, in welchem der fibrotische Umbau bereits weitgehend abgeschlossen oder stabilisiert ist, sind demnach weniger FAP⁺ Zellen zu erwarten.²¹⁹ Die fibrotische ECM-Matrix hingegen bleibt bestehen. Demnach korreliert

die FAP-Expression nicht mit dem Ausmaß an fibrotischem Schaden im Gewebe und es scheint wichtig zu sein die zeitliche Komponente bzw. das Stadium der Fibrose in der Interpretation zu berücksichtigen. Es ist bekannt, dass die FAP⁺/POSTN⁺ Transkriptions-Signatur beispielsweise nach einer Myokardschädigung durch einen Myokardinfarkt bereits sehr früh nach dem Ereignis ihren Höhepunkt erreicht, bevor sie über eine Periode von 3 Monaten abfällt. Allerdings bleibt sie im Vergleich zum Ausgangsniveau langfristig erhöht.²¹³ *Lineage tracing* Studien konnten demonstrieren, dass FAP⁺/POSTN⁺-Fibroblasten nicht den gleichen zellulären Ursprung haben, wie α -SMA⁺ Myofibroblasten. Auch konnte gezeigt werden, dass entzündliche Zytokine (u.a. IL-1 β) aus Monozyten und Makrophagen eine wichtige Rolle in der Regulation der FAP Expression spielen. Die Transkriptionsfaktoren *Runt-related transcription factor 1* (RUNX1) und *Mesenchyme Homeobox 1* (MEOX1) scheinen im Prozess der Differenzierung zu FAP⁺/POSTN⁺ Fibroblasten eine wichtige Rolle zu spielen.²²⁰

FAP⁺ Fibroblasten können selbst offenbar teilweise Kollagen produzieren und sezernieren, tragen zum anderen durch ihre proteolytische Aktivität jedoch maßgeblich zur Modifikation/Abbau von ECM, als Grundlage jeglicher ECM Restrukturierung (reparativer oder fibrotischer Art).

Jedoch ist die FAP-Expression keineswegs spezifisch für fibrotischen Umbau. So stehen FAP⁺ Fibroblasten in Interaktion mit der immunologischen (zellulären) Umgebung – die FAP Expression wird durch floride Inflammation getriggert und umgekehrt beeinflussen FAP⁺ Fibroblasten die Entzündungsreaktion mit. So konnte in einem Mausmodell der inflammatorischen Arthritis gezeigt werden, dass die selektive Deletion von FAP⁺ Fibroblasten sowohl Entzündung als auch erosiven Schaden reduziert.²²¹ Auch in der Interpretation der ⁶⁸Ga-FAPI-04 PET-CT – Bildgebung gilt es diesen Punkt stets im Hinterkopf zu behalten, so kann z.B. eine akute infektiöse Pneumonie (ganz ohne fibrotischen oder malignen Gewebeumbau) FAPI Anreichern (d.h. in Folge der Inflammationsreaktion und konsekutiven Gewebereparatur wird transient die FAP Expression erhöht.²²²

Dabei scheinen auch FAP⁺ Fibroblasten funktionell keineswegs eine homogene Zellpopulation darzustellen - so konnte u.a. in der Synovia FAP α ⁺THY1⁺proinflammatorisches und FAP α ⁺THY1⁻ vorwiegend gewebedestruktive Fibroblasten Subsets identifiziert werden.²²¹ Die spezifische Rolle FAP⁺ Fibroblasten scheint damit möglicherweise durch den Gewebe und pathophysiologischen Gesamtkontext bestimmt zu werden.

4.3.2.3.3. FAP⁺/POSTN⁺ Fibroblasten im Kontext von entzündlich-fibrotischen Herzerkrankungen

Die identifizierte Population an FAP⁺/POSTN⁺ Fibroblasten im Myokard präsentierte sich relativ hochreguliert in der a-HI verglichen mit der SSc-pHI. Angesichts der Bedeutung von FAP⁺ Fibroblasten für das aktive Geweberemodeling ist diese Beobachtung, in Hinblick auf die verstärkte Fibrosereaktion in der SSc-pHI, zunächst erstaunlich, lässt sich jedoch durchaus erklären. Zu bedenken wären folgende Punkte:

1. Zeitliche Komponente: POSTN und FAP sind typische Marker für aktivierte Fibroblasten, deren Expression ein charakteristisches Maximum in der frühen/inflammatorischen Phase der Erkrankung zeigt, während andere aktivierte Fibroblasten Subsets im weiteren Verlauf (nach Auflösung der Entzündung) die dominierende Rolle z.B. bei der ECM Produktion und damit dem Voranschreiten der Fibrose übernehmen. Die klinischen Daten, die derzeit vorliegen sind leider nicht ausreichend, um eine sichere Korrelation mit z.B. der Erkrankungsdauer zu erstellen. Aus diesem Grund kann das Argument nicht abschließend bestätigt werden.

2. Analyse von relativen Häufigkeiten und Prädominanz anderer ECM-produzierender Fibroblasten-Subsets in der SSc-pHI: Da lediglich Angaben zur relativen Häufigkeit einzelner Stromazell-Cluster in den unterschiedlichen Krankheitsentitäten gemacht werden kann, muss bei der Interpretation der Ergebnisse aufgepasst werden. So kommen alle Stromazell-Cluster zu unterschiedlichen Anteilen in allen drei Krankheitsentitäten vor – eine Prädominanz eines Clusters z.B. gehäuftes Vorkommen von FAP⁺/POSTN⁺ Cluster in der a-HI ist somit keineswegs exklusiv zu werten, zeigt jedoch, dass in der SSc-pHI offenbar andere Cluster quantitativ gesehen von größerer Relevanz sind. Auch die offensichtliche Expansion der Stromazellen in der SSc-pHI darf bei der Betrachtung prozentualer Zahlen nicht vergessen werden. Histologisch zeichnet sich die SSc-pHI durch mehr Kollagenablagerungen aus. Die FAP⁺/POSTN⁺ Fibroblasten zeigen in dem vorliegenden Datensatz jedoch keine relevante ECM Koexpression, so dass ganz offensichtlich andere Stromazell-Cluster verantwortlich für die ECM-Produktion sind. Auch den Erkenntnissen der 68Ga-FAPI-04 PET-CT Studien in der SSc können dies nicht widerlegen. Nachweis von Relevanz einer Zellpopulation kann eine höhere Relevanz einer anderen Zellpopulation nicht ausschließen.

3. Unzureichende qualitative Charakterisierung der Cluster: Auch muss bedacht werden, dass allein aus dem quantitativen Vergleich eine Zellpopulation nicht einfach auf die funktionelle Relevanz geschlossen werden kann. So könnten sich die FAP⁺/POSTN⁺ Fibroblasten z.B. in der epigenetischen Prägung relevant unterscheiden zwischen SSc-pHI und a-HI. So wäre es denkbar, dass in der a-HI zwar signifikant mehr FAP⁺/POSTN⁺ Fibroblasten am reparativen Geweberemodeling beteiligt sind, in der SSc-pHI hingegen weniger FAP⁺/POSTN⁺ Fibroblasten vorkommen, diese jedoch einen seneszenten Phänotyp aufweisen und dadurch über eine stärker profibrotische Potenz verfügen als in der a-HI.

4. Höherer Grad an (lymphozytärer) Inflammation und vermehrte FAP⁺ Expression in der a-HI: Da FAP u.a. durch Inflammation getriggert wird und wiederum Inflammation aufrecht zu erhalten scheint, könnte die erhöhte FAP Expression in der a-HI Ausdruck der stärkeren lymphozytäre Inflammation im Gewebe sein. In der SSc-pHI mit weniger stark ausgeprägter lymphozytärer Entzündung haben hingegen (u.a. durch Vermittlung von CD163⁺ M2 Makrophagen) andere aktivierte Fibroblasten Subsets die Oberhand und bestimmen damit den individuellen und charakteristischen Verlauf der Fibrosereaktion in der SSc-pHI mit.

Eine unerwartete Beobachtung wurde in einem Bleomycin-Mausmodell gemacht: Nachdem gezeigt wurde, dass die FAP Expression in dem Modell mit der Schwere der Lungenfibrose korrelierte wurde, um die pathophysiologische Rolle der FAP⁺ Zellen besser einzugrenzen, ein Versuch in FAP defizienten Mäusen durchgeführt. Überraschenderweise führte die generelle Abwesenheit von FAP zu einer Exazerbation der resultierenden Lungenfibrose und verkürztem Überleben bzw. Wiederherstellung der FAP Expression zu Reduktion der Kollagenlast auf das Niveau von (Bleomycin behandelten) Wildtypmäusen. Mechanistisch wurde die wichtige Rolle von FAP beim Kollagenabbau und der Matrixhomöostase, indem es durch MMPs vorgespaltene Kollagenfragmente weiterverarbeitet und deren Clearance erleichtert, herausgearbeitet.²²³ Diese Studie zeigt, dass die Rolle einer Zellpopulation (*in vivo*) selten als schwarz-oder-weiß betrachtet werden kann. Auch die Rolle von FAP⁺ Fibroblasten scheint im Kontext von Fibrose im Detail sehr komplex zu sein – mit (in speziellen Situationen) unter Umständen durchaus auch Fibrose-protectivem Potenzial. Obgleich an dieser Stelle klargestellt werden soll, dass hochrangig publizierte Studien welche eine Fibrosereduktion und eine Förderung von Regeneration unter FAP Inhibition – insbesondere auch im Herzen - postulieren, zahlenmäßig derzeit deutlich überwiegen. (z.B.^{192,218,224})

4.3.2.4. PI16⁺ ECM produzierende Fibroblasten

4.3.2.4.1 Hintergrundwissen PI16⁺ Fibroblasten und ECM produzierende Fibroblasten Subsets im Myokard

In der SSc-pHI stellte sich von allen ECM (COL1A1/POSTN) produzierenden Zellclustern im Speziellen die PI16⁺ (Peptidase-Inhibitor 16) Stromazellen hochreguliert dar. In der SSc-pHI wurde dieses Zellcluster bislang noch nicht spezifisch untersucht, jedoch in anderen Organen/ bzw. im Kontext anderer Pathologien. Es existiert bis heute jedoch nur ein unzusammenhängendes Bild der Zellpopulation. Es gilt zudem zu beachten, dass die meisten Studien die Zellpopulation auf RNA-Ebene untersucht haben. Die Sekretion von PI16 wird in Fibroblasten u.a. durch mechanischen Stress oder inflammatorische Stimuli gefördert. Im Gewebe ist PI16 ein Inhibitor der Matrixmetalloproteinase 2.²²⁵ Untersuchungen auf Transkriptionsebene zeigten zudem: PI16⁺ Stromazellen scheinen in verschiedenen Geweben u.a. dem Herz in Ruhe als mesenchymale Vorläufer für spezialisierte Fibroblasten-Subtypen zu fungieren. Durch eine geeignete Stimulation (z.B. durch einen Gewebeschaden) kommt es zu Rekrutierung der Population. Möglicherweise spielt die Inaktivierung von *Hypermethylated in cancer 1* (Hic1) eine wichtige Rolle in der Aktivierung und Expansion der PI16⁺ Vorläuferzellen.²²⁶ Buechler et al. (2021) untersuchten die fibroblastäre Abstammung über verschiedene Gewebe hinweg (in murinem und humanem Gewebe) und kamen zu dem Schluss, dass die PI16⁺ Stromazellpopulation als zentraler Ursprungspool für diverse, kontext-spezifische Fibroblasten-Subpopulationen dient.²²⁷ Die PI16⁺Population scheint insbesondere während der Wundheilung und im Kontext von fibrotischen Erkrankungen als Zelllinie (u.a. für Kollagen-produzierende Fibroblasten) von Bedeutung zu sein.^{228,229} Neben der Produktion von extrazellulärer

Matrix scheinen PI16⁺ Fibroblasten u.a. auch an Rekrutierung/Extravasation und Aktivierung von Immunzellen durch die Produktion von entzündlichen Zytokinen beteiligt zu sein.²²⁶

Grundsätzlich ist die Heterogenität ECM produzierender Fibroblasten zwischen verschiedenen Organen (aber auch innerhalb eines Organs) sowie in unterschiedlichen fibrosierenden Erkrankungen noch weitgehend unverstanden. Es deutet sich jedoch an, dass es nicht die eine, universelle, hoch ECM produzierende Fibroblasten-Subpopulation gibt. So waren z.B. in SSc-Haut (im Vergleich zu gesunden Normalspendern) in der IMC-Studie von Rigau et al 2024 eine hohe Zahl an PI16⁺ Fibroblasten mit einer milderen Hautfibrose assoziiert.²³⁰ In fibrosierenden Lungenerkrankungen konnten auf RNA Ebene verschiedene Kollagen-produzierende Fibroblasten-Subsets in distinkten anatomischen Lokalisationen nachgewiesen werden, z.B. PI16⁺ DCN⁺ Fibroblasten in der adventitialen Manschette.²²⁹ Obgleich ein Atlas für Kollagen-produzierende Fibroblasten in Myokard bis dato noch nicht publiziert wurde, so ist doch bekannt, dass auch im Myokard unterschiedliche anatomische Bereiche mit distinkten Fibroblasten-Subsets existieren.²³¹

4.3.2.4.2 PI16⁺(und PI16⁻) ECM produzierende Fibroblasten im Kontext von entzündlich-fibrotischen Herzerkrankungen

In der vorliegenden Analyse konnten zwei verschiedene Kollagen-produzierende Stromazell-Cluster identifiziert werden, die sich in der PI16 Expression voneinander abgrenzen: PI16⁺/COL1A1^{high}/POSTN⁺ sowie PI16⁻/COL1A1⁺/POSTN⁺ Cluster. In der SSc-pHI zeigte sich verglichen mit den anderen beiden Krankheitsentitäten eine höhere Frequenz des PI16⁺ ECM produzierenden Clusters. Da Kollagen ein extrazellulär sezerniertes Protein ist, sollte die proteomische Analyse kollagenproduzierender Zellen innerhalb einer segmentierten Zelle mit Vorsicht interpretiert werden. Allerdings wurde die verwendete Segmentationsmaske bewusst eng um den Nukleus gelegt, wodurch die versehentliche Erfassung extrazellulärer Proteine erheblich reduziert wurde. Zudem lässt sich der Ursprung des extrazellulären Kollagens durch die Mitsegmentierung in die angrenzende Stromazelle sehr gut zuordnen. So zeigt sich in der *Heatmap* (Abb. 20) kein ubiquitäres Kollagensignal z.B. in Endothelzellen obgleich histologisch in den meisten Proben u.a. eine perivaskuläre Fibrosierung beschrieben wird.

4.3.2.5. CD34⁺ Stromazellen

4.3.2.5.1. CD34⁺ Stromazellen im Myokard

Das Glykoprotein CD34 (*Cluster of differentiation 34*) ist v.a. als hämatopoetisches Vorläuferzellantigen bekannt, wird jedoch auch von anderen Zelltypen u.a. Endothelzellen, Telozyten oder Stromazellen exprimiert und bindet u.a. Selectine. CD34⁺ Stromazellen scheinen eine heterogene Zellpopulation darzustellen, der jedoch u.a. Vorläuferzell-Eigenschaften und reparative Funktionen im Rahmen von Wundheilung (sowie im pathologischen Kontext in der Fibrosereaktion) zugeschrieben werden. Im Myokard wurden interstitielle Fibroblasten u.a. durch CD34 Expression charakterisiert. Interstitielle Fibroblasten im Myokard umgeben die Kardiomyozyten

und haben mit der von ihnen geformten ECM eine besondere Relevanz für die Aufrechterhaltung der mechanisch-funktionellen Eigenschaften des myokardialen Gewebes.²³¹ Im pathologischen Kontext scheinen gewebeständige CD34⁺ Stromazellen als Vorläuferpool sowohl für endotheliale Reparatur/Angiogenese nach vaskulärem Schaden sowie zur interstitiellen Fibrose beizutragen. Mittels eines *lineage tracing* Mausmodells sowie Analyse von scRNA-Seq Datensätzen konnte u.a. gezeigt werden, dass CD34⁺/PI16⁺ Zellen im Fibrose-Kontext, in verschiedenen Organen z.B. Niere und Herz, als Vorläuferzellen für aktivierte Fibroblasten in Erscheinung treten.²³²

4.3.2.5.2. CD34⁺ Stromazellen in der SSc-pHI

In der SSc-pH fiel im Vergleich zur a-HI und i-HI innerhalb der Stromazellen die hohe Frequenz von CD34⁺ Stromazellen auf. Die genaue pathophysiologische Bedeutung der Stromazellpopulation kann an dieser Stelle nicht abschließend geklärt werden. Die Hypothese, dass CD34⁺ Stromazellen als wichtiger Pool für aktivierte Fibroblasten in der SSc-pHI fungieren z.B. PI16⁺-ECM produzierende Fibroblasten liegt jedoch nahe. Studien aus anderen Organen lassen sogar die Hypothese zu, dass es sich bei den CD34⁺ Stromazellen möglicherweise um eine zentrale Vorläuferpopulation für profibrotisch-aktivierte Fibroblasten handeln könnte. So konnte z.B. in der Osteoarthritis zwei unterschiedliche Subtypen, nämlich einem inflammatorischem (stark schmerzassoziierten) und einem fibrotischen Subtyp, festgestellt werden. Mittels scRNA-Seq konnten zwischen diesen beiden Subtypen in der synovialen Stromazellnische deutliche Unterschiede festgestellt werden. Der fibrotische klinische Subtyp wurde insbesondere durch die hohe Prävalenz von CD34⁺ Stromazellen charakterisiert.²³³

4.4. Outlook

Die rasante Entwicklung neuer Omics-Technologien eröffnet vielversprechende Perspektiven, insbesondere bei der Erforschung seltener Erkrankungen/ bzw. Erkrankungskomplikationen, wie der SSc-pHI. Diese innovativen Ansätze ermöglichen ein tieferes Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen und bieten die Grundlage für die Identifikation neuer diagnostischer und therapeutischer Zielstrukturen. Der Wert explorativer Omics-Studien liegt darin unbekannte molekulare und zelluläre Mechanismen aufzudecken, die in nachfolgenden Projekten, sowohl ex vivo als auch in vivo, detaillierter untersucht werden können.

So legen die präsentierten Daten eine weitere Untersuchung der Rolle von (M2-) Makrophagen sowie Mastzellpopulationen im Herzen, sowie weiterer Charakterisierung der Stromazell-Heterogenität in der SSc-pHI nahe. Die Ergebnisse fordern eine kritische Auseinandersetzung mit der spezifischen Rolle unterschiedlicher Fibroblasten-Subpopulationen (z.B. FAP⁺ Zellen, α -SMA⁺ Myofibroblasten) in vivo ein. In unserem Fall zeichnet sich die SSc-pHI auf Stromazellebene insbesondere durch eine hohe Prävalenz PI16⁺ ECM^{high}-produzierender Fibroblasten aus. Dieses Cluster scheint im Myokard maßgeblich für die histologisch beschriebene verstärkte Fibrosereaktion in der SSc-pHI verantwortlich und könnten somit das schlechtere klinische Outcome der

Patienten im Vergleich zu anderen Formen entzündlich-fibrotischer Herzerkrankungen erklären.

Trotz der gesteigerten Tiefe der Analysen hat jedes IMC-Panel seine spezifischen Schwerpunkte. Aus diesem Grund ist bereits ein metabolisches Panel zur Untersuchung der gleichen Kohorte in Arbeit. Darüber hinaus arbeiten wir an einer integrierten Untersuchung mittels *Spatial Transcriptomics*, um identifizierte Zellcluster und Gewebenischen präziser zu charakterisieren.

Die neuen Omics-Verfahren zeigen eindrücklich, dass die zelluläre Realität weitaus komplexer ist als bisher angenommen. Historische Konzepte, wie die Schlüsselrolle der (α -SMA⁺)Myofibroblasten in der Fibrose, müssen vor dem Hintergrund der erkannten funktionellen und zellulären Heterogenität kritisch hinterfragt werden. Gewebe- und krankheitsspezifische Unterschiede rücken zunehmend in den Fokus und eröffnen neue Wege zur Optimierung diagnostischer Ansätze und zur Entwicklung wirksamerer und zielgerichteter Therapien.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Übersicht über die Pathogenese der systemischen Sklerose	4
Abb. 2 Mögliche klinische Manifestationen der systemischen Sklerose	10-11
Abb. 3 Klinik und Abgrenzung der primären Herzbeteiligung bei systemischer Sklerose	18
Abb. 4 Prinzip der Datenerfassung mittels Imaging Mass Cytometrie (IMC)	38
Abb. 5 Übersicht Maxpar X8 Labeling Workflow	42
Abb. 6 Beispiel einer Antikörper-Titration.....	43
Abb. 7 Beispiel eines Objektträgers während IMC-Messung	47
Abb. 8 Zwei zufällig ausgewählte exemplarische ROIs als „pseudo-colorierte“ Mehrkanalbilder	49
Abb. 9 Darstellung einer exemplarischen ROI mit <i>thumbnail collage</i> der Einzelkanälen und „pseudo-coloriertes“ Mehrkanalbild	49
Abb. 10 Darstellung einer exemplarischen ROI mit „pseudo-coloriertes“ Mehrkanalbild und Darstellung der Einzelzellsegmentationsmaske (verschiedene Darstellungen).....	54
Abb. 11 Übersicht Struktur eines spatial element object (spe) in R	56
Abb. 12 Darstellung nach Anwendung des Größenfilters auf die Einzelzellmaske.....	57
Abb. 13 Beispiel für Gating in cytomapperShiny Anwendung.....	59
Abb. 14 Verteilung der Zellen nach Gates.....	60
Abb. 15 Überblick über die <i>supervised</i> und <i>unsupervised</i> Annotation der Zellen	61
Abb. 16 (CD45+) Immunzell-Cluster: Darstellung in reduzierten Dimensionen.....	64
Abb. 17 Heatmaps: Markerexpression in (CD45+) Immunzell-Cluster.....	67
Abb. 18 Darstellung der CD68 ⁺ TPSAB1 ⁺ Zellen im Bild.....	68
Abb. 19 (CD45-) Nicht-Immunzell-Cluster: Darstellung in reduzierten Dimensionen	69
Abb. 20 Heatmaps: Markerexpression in (CD45-) Nicht-Immunzell-Cluster	71
Abb. 21 Häufigkeitsverteilung der Cluster in verschiedenen Krankheitsentitäten.....	73
Abb. 22 Impression über die räumliche Verteilung unterschiedlicher Zellpopulationen in unterschiedlichen Krankheitsentitäten	74
Abb. 23 Komposition der Zellpopulationen im Gesunden Myokard - basierend auf publizierten Daten von Litviňuková et al. (2020).....	75
Abb. 24 Häufigkeitsverteilung der Zellpopulationen in Krankheitsentitäten	76
Abb. 25 Häufigkeitsverteilung (CD45+) Immunzell-Cluster zwischen Krankheitsentitäten	77
Abb. 26 Radar Chart: Definierte Immunzell-Cluster vs Krankheitsentität.....	78
Abb. 27 Radar Chart: definierte Stromazell-Cluster vs Krankheitsentität.....	79
Abb. 28 Häufigkeitsverteilung definierte Stromazell-Cluster zwischen Krankheitsentitäten	79
Abb. 29 Häufigkeitsverteilung definierte vaskulärer Zell-Cluster zwischen Krankheitsentitäten	80
Abb. 30 Radar Chart: Definierte vaskulärer Zell-Cluster vs Krankheitsentität: z-rescaled Daten; Krankheitsentitäten	80
Abb. 31 Patientenspezifische Variabilität in Immunzell-Cluster-Frequenz	81
Abb. 32 Patientenspezifische Variabilität in Stromazell-Cluster-Frequenz.....	81-82
Abb. 33 Patientenspezifische Variabilität in vaskulärer Zell-Cluster-Frequenz: Krankheitsentitäten.....	81-82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 ACR/EULAR Klassifikationskriterien (2013) der systemischen Sklerose	11
Tabelle 2 Zusammenfassung histologischer Charakteristika der primären Herzbeteiligung bei systemischer Sklerose (SSc-pHI)	24
Tabelle 3 Myokarditis Grading nach Basso et al (2013)	31
Tabelle 4 Myokarditis Staging nach Basso et al (2013).....	31
Tabelle 5 Patientencharakteristika	36
Tabelle 6 IMC Panel: Metalle, Antikörper und eingesetzte Verdünnungen.....	44-45
Tabelle 7 Ausgewählte Parameter in steinbock für die folgende Einzelzellsementation.....	52
Tabelle 8 (CD45+) Immunzell-Cluster Marker und biologische Cluster-Bezeichnung.....	66
Tabelle 9 (CD45-) Nicht-Immunzell-Cluster Marker und biologische Cluster-Bezeichnung.....	72
Tabelle 10 Häufigkeit CD45+ Zellen in den unterschiedlichen untersuchten Krankheitsentitäten	73

Referenzen

1. Wollheim FA. Classification of systemic sclerosis. Visions and reality. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44:1212–6.
2. Silva U de, Parish LC. Historical approach to scleroderma. *Clin Dermatol* 1994;12:201–5.
3. Goetz RH, Berne MB. Pathology of progressive systemic sclerosis (generalized scleroderma) with special reference to changes in the viscera. In: *Clin Proc.* p. 337–92.
4. Zhong L, Pope M, Shen Y, Hernandez JJ, Wu L. Prevalence and incidence of systemic sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Int J Rheum Dis* 2019;22:2096–107.
5. Bairkdar M, Rossides M, Westerlind H, Hesselstrand R, Arkema EV, Holmqvist M. Incidence and prevalence of systemic sclerosis globally: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *Rheumatology (Oxford)* 2021;60:3121–33.
6. Bergamasco A, Hartmann N, Wallace L, Verpillat P. Epidemiology of systemic sclerosis and systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. *Clin Epidemiol* 2019;11:257–73.
7. Calderon LM, Pope JE. Scleroderma epidemiology update. *Curr Opin Rheumatol* 2021;33:122–7.
8. Volkmann ER, Andréasson K, Smith V. Systemic sclerosis. *Lancet* 2022.
9. Ota Y, Kuwana M. Updates on genetics in systemic sclerosis. *Inflamm Regen* 2021;41:17.
10. Rezaei R, Aslani S, Dashti N, Jamshidi A, Gharibdoost F, Mahmoudi M. Genetic implications in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Int J Rheum Dis* 2018;21:1478–86.
11. Ferri C, Arcangeletti M-C, Caselli E, et al. Insights into the knowledge of complex diseases: Environmental infectious/toxic agents as potential etiopathogenetic factors of systemic sclerosis. *J Autoimmun* 2021;124:102727.
12. Yu J, Tang R, Ding K. Epigenetic Modifications in the Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Int J Gen Med* 2022;15:3155–66.
13. Altorok N, Kahaleh B. Epigenetics and systemic sclerosis. *Semin Immunopathol* 2015;37:453–62.
14. Altorok N, Tsou P-S, Coit P, Khanna D, Sawalha AH. Genome-wide DNA methylation analysis in dermal fibroblasts from patients with diffuse and limited systemic sclerosis reveals common and subset-specific DNA methylation aberrancies. *Ann Rheum Dis* 2015;74:1612–20.
15. Tsou P-S, Sawalha AH. Unfolding the pathogenesis of scleroderma through genomics and epigenomics. *J Autoimmun* 2017;83:73–94.
16. Tsou P-S, Varga J, O'Reilly S. Advances in epigenetics in systemic sclerosis: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat Rev Rheumatol* 2021;17:596–607.
17. Soldan SS, Lieberman PM. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Nat Rev Microbiol* 2023;21:51–64.
18. Moroncini G, Mori S, Tonnini C, Gabrielli A. Role of viral infections in the etiopathogenesis of systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2013;31:3–7.

19. Boddy AM, Fortunato A, Wilson Sayres M, Aktipis A. Fetal microchimerism and maternal health: a review and evolutionary analysis of cooperation and conflict beyond the womb. *Bioessays* 2015;37:1106–18.
20. Peoples C, Medsger TA JR, Lucas M, Rosario BL, Feghali-Bostwick CA. Gender differences in systemic sclerosis: relationship to clinical features, serologic status and outcomes. *J Scleroderma Relat Disord* 2016;1:177–240.
21. Maria ATJ, Partouche L, Goulabchand R, et al. Intriguing Relationships Between Cancer and Systemic Sclerosis: Role of the Immune System and Other Contributors. *Front Immunol* 2018;9:3112.
22. Volkman ER, Andréasson K, Smith V. Systemic sclerosis. *Lancet* 2023;401:304–18.
23. Matucci-Cerinic M, Kahaleh B, Wigley FM. Review: evidence that systemic sclerosis is a vascular disease. *Arthritis Rheum* 2013;65:1953–62.
24. Asano Y, Sato S. Vasculopathy in scleroderma. *Semin Immunopathol* 2015;37:489–500.
25. Chora I, Guiducci S, Manetti M, et al. Vascular biomarkers and correlation with peripheral vasculopathy in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 2015;14:314–22.
26. Mizuno R, Fujimoto S, Saito Y, Nakamura S. Cardiac Raynaud's phenomenon induced by cold provocation as a predictor of long-term left ventricular dysfunction and remodelling in systemic sclerosis: 7-year follow-up study. *Eur J Heart Fail* 2010;12:268–75.
27. Cutolo M, Sulli A, Smith V. Assessing microvascular changes in systemic sclerosis diagnosis and management. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6:578–87.
28. Hughes M, Allanore Y, Chung L, Pauling JD, Denton CP, Matucci-Cerinic M. Raynaud phenomenon and digital ulcers in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* 2020;16:208–21.
29. Mostmans Y, Cutolo M, Giddelo C, et al. The role of endothelial cells in the vasculopathy of systemic sclerosis: A systematic review. *Autoimmun Rev* 2017;16:774–86.
30. Distler JHW, Gay S, Distler O. Angiogenesis and vasculogenesis in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45 Suppl 3:iii26–7.
31. Patnaik E, Lyons M, Tran K, Pattanaik D. Endothelial Dysfunction in Systemic Sclerosis. *Int J Mol Sci* 2023;24.
32. Sgonc R, Gruschwitz MS, Boeck G, Sepp N, Gruber J, Wick G. Endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis is induced by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity via CD95. *Arthritis Rheum* 2000;43:2550–62.
33. Di Benedetto P, Ruscitti P, Berardicurti O, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition in systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 2021;205:12–27.
34. Manetti M, Romano E, Rosa I, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to endothelial dysfunction and dermal fibrosis in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2017;76:924–34.

35. Distler JHW, Jünger A, Pileckyte M, et al. Hypoxia-induced increase in the production of extracellular matrix proteins in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2007;56:4203–15.
36. Rius Rigau A, Li Y-N, Matei A-E, et al. Characterization of Vascular Niche in Systemic Sclerosis by Spatial Proteomics. *Circ Res* 2024;134:875–91.
37. Ntelis K, Bogdanos D, Dimitroulas T, Sakkas L, Daoussis D. Platelets in Systemic Sclerosis: the Missing Link Connecting Vasculopathy, Autoimmunity, and Fibrosis? *Curr Rheumatol Rep* 2019;21:15.
38. Cole A, Ong VH, Denton CP. Renal Disease and Systemic Sclerosis: an Update on Scleroderma Renal Crisis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2023;64:378–91.
39. Haque A, Kiely DG, Kovacs G, Thompson AAR, Condliffe R. Pulmonary hypertension phenotypes in patients with systemic sclerosis. *Eur Respir Rev* 2021;30.
40. Robertson Parkman, Ami J Shah, Bernadette Masinsin, Neena Kapoor, Hisham Abdel-Azim, Andreas Reiff. Chronic Graft-Versus-Host Disease and Systemic Sclerosis: The Same Pathophysiology? *Blood* 2011;118:4076. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497119620021>).
41. Barausse G, Caramaschi P, Scambi C, et al. Clinical, serologic and instrumental data of ten patients affected by sclerodermatous chronic graft versus host disease: similarities and differences in respect to systemic sclerosis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2010;23:373–7.
42. Fang D, Chen B, Lescoat A, Khanna D, Mu R. Immune cell dysregulation as a mediator of fibrosis in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* 2022;18:683–93.
43. Cavazzana I, Vojinovic T, Airo' P, et al. Systemic Sclerosis-Specific Antibodies: Novel and Classical Biomarkers. *Clin Rev Allergy Immunol* 2023;64:412–30.
44. Senécal J-L, Hoa S, Yang R, Koenig M. Pathogenic roles of autoantibodies in systemic sclerosis: Current understandings in pathogenesis. *J Scleroderma Relat Disord* 2020;5:103–29.
45. Akbarzadeh R, Müller A, Humrich JY, Riemekasten G. When natural antibodies become pathogenic: autoantibodies targeted against G protein-coupled receptors in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Front Immunol* 2023;14:1213804.
46. Moroncini G, Svegliati Baroni S, Gabrielli A. Agonistic antibodies in systemic sclerosis. *Immunol Lett* 2018;195:83–7.
47. Truchetet ME, Brembilla NC, Chizzolini C. Current Concepts on the Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2023;64:262–83.
48. Raja J, Denton CP. Cytokines in the immunopathology of systemic sclerosis. *Semin Immunopathol* 2015;37:543–57.
49. Worrell JC, O'Reilly S. Bi-directional communication: Conversations between fibroblasts and immune cells in systemic sclerosis. *J Autoimmun* 2020;113:102526.
50. O'Reilly S. Innate immunity in systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 2020;201:12–3.
51. Lin C, Jiang Z, Cao L, Zou H, Zhu X. Role of NLRP3 inflammasome in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 2022;24:196.

52. Brown M, O'Reilly S. The immunopathogenesis of fibrosis in systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 2019;195:310–21.
53. Henderson NC, Rieder F, Wynn TA. Fibrosis: from mechanisms to medicines. *Nature* 2020;587:555–66.
54. Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med* 2009;360:1989–2003.
55. Younesi FS, Miller AE, Barker TH, Rossi FMV, Hinz B. Fibroblast and myofibroblast activation in normal tissue repair and fibrosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2024.
56. Deng C-C, Hu Y-F, Zhu D-H, et al. Single-cell RNA-seq reveals fibroblast heterogeneity and increased mesenchymal fibroblasts in human fibrotic skin diseases. *Nat Commun* 2021;12:3709.
57. Nagaraju CK, Robinson EL, Abdesslem M, et al. Myofibroblast Phenotype and Reversibility of Fibrosis in Patients With End-Stage Heart Failure. *J Am Coll Cardiol* 2019;73:2267–82.
58. Wang S, Friedman SL. Hepatic fibrosis: A convergent response to liver injury that is reversible. *J Hepatol* 2020;73:210–1.
59. Wohlfahrt T, Rauber S, Uebe S, et al. PU.1 controls fibroblast polarization and tissue fibrosis. *Nature* 2019;566:344–9.
60. Leong E, Bezuhy M, Marshall JS. Distinct Metalloproteinase Expression and Functions in Systemic Sclerosis and Fibrosis: What We Know and the Potential for Intervention. *Front Physiol* 2021;12:727451.
61. Leask A, Naik A, Stratton RJ. Back to the future: targeting the extracellular matrix to treat systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* 2023;19:713–23.
62. Herrera J, Henke CA, Bitterman PB. Extracellular matrix as a driver of progressive fibrosis. *J Clin Invest* 2018;128:45–53.
63. Fiore VF, Wong SS, Tran C, et al. $\alpha\beta 3$ Integrin drives fibroblast contraction and strain stiffening of soft provisional matrix during progressive fibrosis. *JCI Insight* 2018;3.
64. Lampi MC, Reinhart-King CA. Targeting extracellular matrix stiffness to attenuate disease: From molecular mechanisms to clinical trials. *Sci Transl Med* 2018;10.
65. Dey A, Varelas X, Guan K-L. Targeting the Hippo pathway in cancer, fibrosis, wound healing and regenerative medicine. *Nat Rev Drug Discov* 2020;19:480–94.
66. Mouawad JE, Feghali-Bostwick C. The Molecular Mechanisms of Systemic Sclerosis-Associated Lung Fibrosis. *Int J Mol Sci* 2023;24.
67. Distler O, Highland KB, Gahlemann M, et al. Nintedanib for Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease. *N Engl J Med* 2019;380:2518–28.
68. Wollin L, Wex E, Pautsch A, et al. Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2015;45:1434–45.
69. Wollin L, Maillet I, Quesniaux V, Holweg A, Ryffel B. Antifibrotic and anti-inflammatory activity of the tyrosine kinase inhibitor nintedanib in experimental models of lung fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther* 2014;349:209–20.
70. Denton CP, Khanna D. Systemic sclerosis. *Lancet* 2017;390:1685–99.
71. Speidel J, Hunzelmann N, Moinzadeh P. Sklerodermie – „die harte Haut“. *Aktuelle Rheumatologie* 2022;47:290–302.

72. Khanna D, Furst DE, Clements PJ, et al. Standardization of the modified Rodnan skin score for use in clinical trials of systemic sclerosis. *J Scleroderma Relat Disord* 2017;2:11–8.
73. Cavazzana I, Vojinovic T, Airo' P, et al. Systemic Sclerosis-Specific Antibodies: Novel and Classical Biomarkers. *Clin Rev Allergy Immunol* 2023;64:412–30.
74. Sobanski V, Giovannelli J, Allanore Y, et al. Phenotypes Determined by Cluster Analysis and Their Survival in the Prospective European Scleroderma Trials and Research Cohort of Patients With Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol* 2019;71:1553–70.
75. Kreitmaier P, Katsoula G, Zeggini E. Insights from multi-omics integration in complex disease primary tissues. *Trends Genet* 2023;39:46–58.
76. Komura K, Yanaba K, Bouaziz J-D, et al. Perspective to precision medicine in scleroderma. *Front Immunol* 2023;14:1298665.
77. Bellando-Randone S, Del Galdo F, Lepri G, et al. Progression of patients with Raynaud's phenomenon to systemic sclerosis: a five-year analysis of the European Scleroderma Trial and Research group multicentre, longitudinal registry study for Very Early Diagnosis of Systemic Sclerosis (VEDOSS). *Lancet Rheumatol* 2021;3:e834–e843.
78. Smith V, Scirè CA, Talarico R, et al. Systemic sclerosis: state of the art on clinical practice guidelines. *RMD Open* 2018;4:e000782.
79. Kowal-Bielecka O, Fransen J, Avouac J, et al. Update of EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2017;76:1327–39.
80. Bergmann C, Müller F, Distler JHW, et al. Treatment of a patient with severe systemic sclerosis (SSc) using CD19-targeted CAR T cells. *Ann Rheum Dis* 2023;82:1117–20.
81. Merkt W, Freitag M, Claus M, et al. Third-generation CD19.CAR-T cell-containing combination therapy in Scl70+ systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2024;83:543–6.
82. Subklewe M, Magno G, Gebhardt C, et al. Application of blinatumomab, a bispecific anti-CD3/CD19 T-cell engager, in treating severe systemic sclerosis: A case study. *Eur J Cancer* 2024;204:114071.
83. Hagen M, Bucci L, Böltz S, et al. BCMA-Targeted T-Cell-Engager Therapy for Autoimmune Disease. *N Engl J Med* 2024;391:867–9.
84. Ebata S, Yoshizaki A, Oba K, et al. Safety and efficacy of rituximab in systemic sclerosis (DESIREs): open-label extension of a double-blind, investigators-initiated, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Rheumatol* 2022;4:e546–e555.
85. Khanna D, Denton CP, Jhreis A, et al. Safety and efficacy of subcutaneous tocilizumab in adults with systemic sclerosis (faSScinate): a phase 2, randomised, controlled trial. *Lancet* 2016;387:2630–40.
86. Tashkin DP, Roth MD, Clements PJ, et al. Mycophenolate mofetil versus oral cyclophosphamide in scleroderma-related interstitial lung disease (SLS II): a randomised controlled, double-blind, parallel group trial. *Lancet Respir Med* 2016;4:708–19.

87. Tashkin DP, Elashoff R, Clements PJ, et al. Cyclophosphamide versus placebo in scleroderma lung disease. *N Engl J Med* 2006;354:2655–66.
88. Sullivan KM, Goldmuntz EA, Keyes-Elstein L, et al. Myeloablative Autologous Stem-Cell Transplantation for Severe Scleroderma. *N Engl J Med* 2018;378:35–47.
89. Walker UA, Saketkoo LA, Distler O. Haematopoietic stem cell transplantation in systemic sclerosis. *RMD Open* 2018;4:e000533.
90. Blagojevic J, Legendre P, Matucci-Cerinic M, Mouthon L. Is there today a place for corticosteroids in the treatment of scleroderma? *Autoimmun Rev* 2019;18:102403.
91. Bukiri H, Volkmann ER. Current advances in the treatment of systemic sclerosis. *Curr Opin Pharmacol* 2022;64:102211.
92. Campochiaro C, Allanore Y. An update on targeted therapies in systemic sclerosis based on a systematic review from the last 3 years. *Arthritis Res Ther* 2021;23:155.
93. Maher TM, Mayes MD, Kreuter M, et al. Effect of Nintedanib on Lung Function in Patients With Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease: Further Analyses of a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Arthritis Rheumatol* 2021;73:671–6.
94. Highland KB, Distler O, Kuwana M, et al. Efficacy and safety of nintedanib in patients with systemic sclerosis-associated interstitial lung disease treated with mycophenolate: a subgroup analysis of the SENSICIS trial. *Lancet Respir Med* 2021;9:96–106.
95. Pope JE, Denton CP, Johnson SR, Fernandez-Codina A, Hudson M, Nevskaya T. State-of-the-art evidence in the treatment of systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* 2023;19:212–26.
96. Über ein eigenartiges Krankheitsbild von diffuser Sklerosis der Haut und innerer Organe. *Virchows Archiv* 1926.
97. Champion HC. The heart in scleroderma. *Rheum Dis Clin North Am* 2008;34:181–90; viii.
98. Bruni C, Buch MH, Djokovic A, et al. Consensus on the assessment of systemic sclerosis-associated primary heart involvement: World Scleroderma Foundation/Heart Failure Association guidance on screening, diagnosis, and follow-up assessment. *J Scleroderma Relat Disord* 2023;8:169–82.
99. Man A, Zhu Y, Zhang Y, et al. The risk of cardiovascular disease in systemic sclerosis: a population-based cohort study. *Ann Rheum Dis* 2013;72:1188–93.
100. Tyndall AJ, Bannert B, Vonk M, et al. Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1809–15.
101. Ross L, Paratz E, Baron M, La Gerche A, Nikpour M. Sudden Cardiac Death in Systemic Sclerosis: Diagnostics to Assess Risk and Inform Management. *Diagnostics (Basel)* 2021;11.
102. Bissell L-A, Md Yusof MY, Buch MH. Primary myocardial disease in scleroderma-a comprehensive review of the literature to inform the UK Systemic Sclerosis Study Group cardiac working group. *Rheumatology (Oxford)* 2017;56:882–95.

103. D'Angelo WA, Fries JF, Masi AT, Shulman LE. Pathologic observations in systemic sclerosis (scleroderma). A study of fifty-eight autopsy cases and fifty-eight matched controls. *Am J Med* 1969;46:428–40.
104. Dumitru RB, Bissell L-A, Erhayiem B, et al. Predictors of subclinical systemic sclerosis primary heart involvement characterised by microvasculopathy and myocardial fibrosis. *Rheumatology (Oxford)* 2021;60:2934–45.
105. Bruni C, Ross L. Cardiac involvement in systemic sclerosis: Getting to the heart of the matter. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2021;35:101668.
106. Elhai M, Avouac J, Walker UA, et al. A gender gap in primary and secondary heart dysfunctions in systemic sclerosis: a EUSTAR prospective study. *Ann Rheum Dis* 2016;75:163–9.
107. Desai CS, Lee DC, Shah SJ. Systemic sclerosis and the heart: current diagnosis and management. *Curr Opin Rheumatol* 2011;23:545–54.
108. Györfi A-H, Filla T, Polzin A, et al. Evaluation of Systemic Sclerosis Primary Heart Involvement and Chronic Heart Failure in the European Scleroderma Trials and Research Cohort. *J Am Heart Assoc* 2025;14:e036730.
109. Nie L-Y, Wang X-D, Zhang T, Xue J. Cardiac complications in systemic sclerosis: early diagnosis and treatment. *Chin Med J (Engl)* 2019;132:2865–71.
110. Nadel A, Nadel M, Taborska N, et al. Heart involvement in patients with systemic sclerosis-what have we learned about it in the last 5 years. *Rheumatol Int* 2024;44:1823–36.
111. Bruni C, Buch MH, Djokovic A, et al. Consensus on the assessment of systemic sclerosis-associated primary heart involvement: World Scleroderma Foundation/Heart Failure Association guidance on screening, diagnosis, and follow-up assessment. *J Scleroderma Relat Disord* 2023;8:169–82.
112. Chew E, Agrawal V, Frech T. Primary Cardiac Involvement in Systemic Sclerosis: Best Approach to Diagnosis. *Rheum Dis Clin North Am* 2023;49:483–8.
113. Bissell L-A, Anderson M, Burgess M, et al. Consensus best practice pathway of the UK Systemic Sclerosis Study group: management of cardiac disease in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2017;56:912–21.
114. Bosello S, Luca G de, Berardi G, et al. Cardiac troponin T and NT-proBNP as diagnostic and prognostic biomarkers of primary cardiac involvement and disease severity in systemic sclerosis: A prospective study. *Eur J Intern Med* 2019;60:46–53.
115. Gokcen N. Serum markers in systemic sclerosis with cardiac involvement. *Clin Rheumatol* 2023;42:2577–88.
116. Fontes Oliveira M, Rei AL, Oliveira MI, Almeida I, Santos M. Prevalence and prognostic significance of heart failure with preserved ejection fraction in systemic sclerosis. *Future Cardiol* 2022;18:17–25.
117. Glynn P, Hale S, Hussain T, Freed BH. Cardiovascular Imaging for Systemic Sclerosis Monitoring and Management. *Front Cardiovasc Med* 2022;9:846213.
118. Mavrogeni S, Pepe A, Gargani L, et al. Cardiac inflammation and fibrosis patterns in systemic sclerosis, evaluated by magnetic resonance imaging: An update. *Semin Arthritis Rheum* 2023;58:152126.

- 119.** Treutlein C, Distler JHW, Tascilar K, et al. Assessment of myocardial fibrosis in patients with systemic sclerosis using (68)GaGa-FAPI-04-PET-CT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2023;50:1629–35.
- 120.** Porcari A, Baggio C, Fabris E, et al. Endomyocardial biopsy in the clinical context: current indications and challenging scenarios. *Heart Fail Rev* 2023;28:123–35.
- 121.** Caforio ALP, Adler Y, Agostini C, et al. Diagnosis and management of myocardial involvement in systemic immune-mediated diseases: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Disease. *Eur Heart J* 2017;38:2649–62.
- 122.** Panopoulos S, Mavrogeni S, Vlachopoulos C, Sfrikakis PP. Cardiac magnetic resonance imaging before and after therapeutic interventions for systemic sclerosis-associated myocarditis. *Rheumatology (Oxford)* 2023;62:1535–42.
- 123.** Batani V, Dagna L, Luca G de. Therapeutic strategies for primary heart involvement in systemic sclerosis. *Rheumatol Immunol Res* 2024;5:72–82.
- 124.** Ninagawa K, Kato M, Tsuneta S, et al. Beneficial effects of nintedanib on cardiomyopathy in patients with systemic sclerosis: a pilot study. *Rheumatology (Oxford)* 2023;62:2550–5.
- 125.** Umbarkar P, Singh AP, Tousif S, Zhang Q, Sethu P, Lal H. Repurposing Nintedanib for pathological cardiac remodeling and dysfunction. *Pharmacol Res* 2021;169:105605.
- 126.** Aimo A, Spitaleri G, Panichella G, Lupón J, Emdin M, Bayes-Genis A. Pirfenidone as a novel cardiac protective treatment. *Heart Fail Rev* 2022;27:525–32.
- 127.** Kariki O, Antoniou C-K, Mavrogeni S, Gatzoulis KA. Updating the Risk Stratification for Sudden Cardiac Death in Cardiomyopathies: The Evolving Role of Cardiac Magnetic Resonance Imaging. *An Approach for the Electrophysiologist. Diagnostics (Basel)* 2020;10.
- 128.** Ross L, Paratz E, Baron M, La Gerche A, Nikpour M. Sudden Cardiac Death in Systemic Sclerosis: Diagnostics to Assess Risk and Inform Management. *Diagnostics (Basel)* 2021;11.
- 129.** Turcotte-Gosselin F, Turgeon PY, Ikic A, et al. Is heart transplantation a valuable option in patients with diffuse systemic sclerosis and primary cardiac involvement? *Clin Case Rep* 2020;8:137–41.
- 130.** D'Angelo WA, Fries JF, Masi AT, Shulman LE. Pathologic observations in systemic sclerosis (scleroderma). A study of fifty-eight autopsy cases and fifty-eight matched controls. *Am J Med* 1969;46:428–40.
- 131.** Alexander EL, Firestein GS, Weiss JL, et al. Reversible cold-induced abnormalities in myocardial perfusion and function in systemic sclerosis. *Ann Intern Med* 1986;105:661–8.
- 132.** Mizuno R, Fujimoto S, Saito Y, Nakamura S. Cardiac Raynaud's phenomenon induced by cold provocation as a predictor of long-term left ventricular dysfunction and remodelling in systemic sclerosis: 7-year follow-up study. *Eur J Heart Fail* 2010;12:268–75.

133. Montisci R, Vacca A, Garau P, et al. Detection of early impairment of coronary flow reserve in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2003;62:890–3.
134. Luca G de, Campochiaro C, Santis M de, et al. Systemic sclerosis myocarditis has unique clinical, histological and prognostic features: a comparative histological analysis. *Rheumatology (Oxford)* 2020;59:2523–33.
135. Luca G de, Cavalli G, Campochiaro C, et al. Interleukin-1 and Systemic Sclerosis: Getting to the Heart of Cardiac Involvement. *Front Immunol* 2021;12:653950.
136. Luca G de, Cavalli G, Campochiaro C, Tresoldi M, Dagna L. Myocarditis: An Interleukin-1-Mediated Disease? *Front Immunol* 2018;9:1335.
137. Caforio ALP, Luca G de, Baritussio A, et al. Serum Organ-Specific Anti-Heart and Anti-Intercalated Disk Autoantibodies as New Autoimmune Markers of Cardiac Involvement in Systemic Sclerosis: Frequency, Clinical and Prognostic Correlates. *Diagnostics (Basel)* 2021;11.
138. Mueller KAL, Mueller II, Eppler D, et al. Clinical and histopathological features of patients with systemic sclerosis undergoing endomyocardial biopsy. *PLoS One* 2015;10:e0126707.
139. Mavrogeni S, Pepe A, Gargani L, et al. Cardiac inflammation and fibrosis patterns in systemic sclerosis, evaluated by magnetic resonance imaging: An update. *Semin Arthritis Rheum* 2023;58:152126.
140. Ross L, Costello B, Brown Z, et al. Myocardial fibrosis and arrhythmic burden in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2022;61:4497–502.
141. Ammirati E, Frigerio M, Adler ED, et al. Management of Acute Myocarditis and Chronic Inflammatory Cardiomyopathy: An Expert Consensus Document. *Circ Heart Fail* 2020;13:e007405.
142. Basso C. Myocarditis. *N Engl J Med* 2022;387:1488–500.
143. Tschöpe C, Ammirati E, Bozkurt B, et al. Myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: current evidence and future directions. *Nat Rev Cardiol* 2021;18:169–93.
144. Falleti J, Orabona P, Municinò M, Castellaro G, Fusco G, Mansueto G. An Update on Myocarditis in Forensic Pathology. *Diagnostics (Basel)* 2024;14.
145. Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD, et al. Myocarditis. A histopathologic definition and classification. *Am J Cardiovasc Pathol* 1987;1:3–14.
146. Basso C, Calabrese F, Angelini A, Carturan E, Thiene G. Classification and histological, immunohistochemical, and molecular diagnosis of inflammatory myocardial disease. *Heart Fail Rev* 2013;18:673–81.
147. Díez J, Boer RA de. Management of cardiac fibrosis is the largest unmet medical need in heart failure. *Cardiovasc Res* 2022;118:e20–e22.
148. Giordano C, Franccone M, Cundari G, Pisano A, d'Amati G. Myocardial fibrosis: morphologic patterns and role of imaging in diagnosis and prognostication. *Cardiovasc Pathol* 2022;56:107391.
149. Basso C, Calabrese F, Angelini A, Carturan E, Thiene G. Classification and histological, immunohistochemical, and molecular diagnosis of inflammatory myocardial disease. *Heart Fail Rev* 2013;18:673–81.

150. Travers JG, Kamal FA, Robbins J, Yutzey KE, Blaxall BC. Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens. *Circ Res* 2016;118:1021–40.
151. Tallquist MD. Cardiac Fibroblast Diversity. *Annu Rev Physiol* 2020;82:63–78.
152. Pesce M, Duda GN, Forte G, et al. Cardiac fibroblasts and mechanosensation in heart development, health and disease. *Nat Rev Cardiol* 2023;20:309–24.
153. Aujla PK, Kassiri Z. Diverse origins and activation of fibroblasts in cardiac fibrosis. *Cell Signal* 2021;78:109869.
154. Harrington A, Moore-Morris T. Cardiac fibroblasts in heart failure and regeneration. *Front Cell Dev Biol* 2024;12:1388378.
155. Mueller KAL, Mueller II, Eppler D, et al. Clinical and histopathological features of patients with systemic sclerosis undergoing endomyocardial biopsy. *PLoS One* 2015;10:e0126707.
156. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2013;65:2737–47.
157. Bandura DR, Baranov VI, Ornatsky OI, et al. Mass cytometry: technique for real time single cell multitarget immunoassay based on inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* 2009;81:6813–22.
158. Giesen C, Wang HAO, Schapiro D, et al. Highly multiplexed imaging of tumor tissues with subcellular resolution by mass cytometry. *Nat Methods* 2014;11:417–22.
159. Glasson Y, Chépeaux L-A, Dumé A-S, et al. Single-cell high-dimensional imaging mass cytometry: one step beyond in oncology. *Semin Immunopathol* 2023;45:17–28.
160. Eling N, Zanutelli V, Daniel M, Schulz D, Windhager J, Meyer L. Analysis workflow for IMC data, Chapter 2: Introduction, compiled 2024-01-05, 2024. (<https://bodenmillergroup.github.io/IMCDataAnalysis/intro.html>).
161. Györfi A-H, Matei A-E, Fuchs M, et al. Engrailed 1 coordinates cytoskeletal reorganization to induce myofibroblast differentiation. *J Exp Med* 2021;218.
162. Rius Rigau A, Li Y-N, Matei A-E, et al. Characterization of Vascular Niche in Systemic Sclerosis by Spatial Proteomics. *Circ Res* 2024;134:875–91.
163. Rius Rigau A, Liang M, Devakumar V, et al. Imaging mass cytometry-based characterisation of fibroblast subsets and their cellular niches in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2024.
164. Jonas Windhager, Bernd Bodenmiller, Nils Eling. An end-to-end workflow for multiplexed image processing and analysis. *bioRxiv* 2020.
165. Jackson HW, Fischer JR, Zanutelli VRT, et al. The single-cell pathology landscape of breast cancer. *Nature* 2020;578:615–20.
166. Stringer C, Wang T, Michaelos M, Pachitariu M. Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation. *Nat Methods* 2021;18:100–6.
167. Greenwald NF, Miller G, Moen E, et al. Whole-cell segmentation of tissue images with human-level performance using large-scale data annotation and deep learning. *Nat Biotechnol* 2022;40:555–65.
168. Park MD, Silvén A, Ginhoux F, Merad M. Macrophages in health and disease. *Cell* 2022;185:4259–79.

169. Chen S, Saeed, Abdullah F U H, Liu Q, et al. Macrophages in immunoregulation and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther* 2023;8:207.
170. Mentkowski KI, Euscher LM, Patel A, Alevriadou BR, Lang JK. Monocyte recruitment and fate specification after myocardial infarction. *Am J Physiol Cell Physiol* 2020;319:C797-C806.
171. Frech TM, Revelo MP, Ryan JJ, et al. Cardiac metabolomics and autopsy in a patient with early diffuse systemic sclerosis presenting with dyspnea: a case report. *J Med Case Rep* 2015;9:136.
172. Holt M, Lin J, Cicka M, Wong A, Epelman S, Lavine KJ. Dissecting and Visualizing the Functional Diversity of Cardiac Macrophages. *Circ Res* 2024;134:1791–807.
173. Al-Adwi Y, Westra J, van Goor H, Burgess JK, Denton CP, Mulder DJ. Macrophages as determinants and regulators of fibrosis in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2023;62:535–45.
174. Wang Y, Zhao M, Liu S, et al. Macrophage-derived extracellular vesicles: diverse mediators of pathology and therapeutics in multiple diseases. *Cell Death Dis* 2020;11:924.
175. van Gorp H, Delputte PL, Nauwynck HJ. Scavenger receptor CD163, a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy. *Mol Immunol* 2010;47:1650–60.
176. Frantz C, Pezet S, Avouac J, Allanore Y. Soluble CD163 as a Potential Biomarker in Systemic Sclerosis. *Dis Markers* 2018;2018:8509583.
177. Dinc T, Zertuche J, El Adili F, Trojanowska M, Bujor A. Scleroderma Fibroblasts Induce Alternative Macrophage Activation via an ERK1/2-dependent Mechanism [abstract]. In: (<https://acrabstracts.org/abstract/scleroderma-fibroblasts-induce-alternative-macrophage-activation-via-an-erk1-2-dependent-mechanism/>. Accessed .).
178. Li J. Bidirectional Interaction of Differently Activated and Polarized Monocytes/Macrophages and Stromal Cells in Context of Tissue Remodeling in Chronic Inflammatory Disease. Dissertation, Universität Heidelberg. 2024.
179. Wendisch D, Dietrich O, Mari T, et al. SARS-CoV-2 infection triggers profibrotic macrophage responses and lung fibrosis. *Cell* 2021;184:6243-6261.e27.
180. Puzyrenko A, Jacobs ER, Padilla N, et al. Collagen-Specific HSP47(+) Myofibroblasts and CD163(+) Macrophages Identify Profibrotic Phenotypes in Deceased Hearts With SARS-CoV-2 Infections. *J Am Heart Assoc* 2023;12:e027990.
181. Chinju A, Moriyama M, Kakizoe-Ishiguro N, et al. CD163+ M2 Macrophages Promote Fibrosis in IgG4-Related Disease Via Toll-like Receptor 7/Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 4/NF-κB Signaling. *Arthritis Rheumatol* 2022;74:892–901.
182. Nakayama T, Sugano Y, Yokokawa T, et al. Clinical impact of the presence of macrophages in endomyocardial biopsies of patients with dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 2017;19:490–8.
183. Pahima HT, Dwyer DF. Update on Mast Cell Biology. *J Allergy Clin Immunol* 2025.

184. Guth C, Limjunyawong N, Pundir P. The evolving role of mast cells in wound healing: insights from recent research and diverse models. *Immunol Cell Biol* 2024;102:878–90.
185. Madjene LC, Pons M, Danelli L, et al. Mast cells in renal inflammation and fibrosis: lessons learnt from animal studies. *Mol Immunol* 2015;63:86–93.
186. Levick SP, Widiapradja A. Mast Cells: Key Contributors to Cardiac Fibrosis. *Int J Mol Sci* 2018;19.
187. Kuppe C, Ramirez Flores RO, Li Z, et al. Spatial multi-omic map of human myocardial infarction. *Nature* 2022;608:766–77.
188. Chia SL, Kapoor S, Carvalho C, Bajénoff M, Gentek R. Mast cell ontogeny: From fetal development to life-long health and disease. *Immunol Rev* 2023;315:31–53.
189. Pincha N, Hajam EY, Badarinath K, et al. PAI1 mediates fibroblast-mast cell interactions in skin fibrosis. *J Clin Invest* 2018;128:1807–19.
190. Moiseeva EP, Roach KM, Leyland ML, Bradding P. CADM1 is a key receptor mediating human mast cell adhesion to human lung fibroblasts and airway smooth muscle cells. *PLoS One* 2013;8:e61579.
191. Aghajanian H, Kimura T, Rurik JG, et al. Targeting cardiac fibrosis with engineered T cells. *Nature* 2019;573:430–3.
192. Legere SA, Haidl ID, Légaré J-F, Marshall JS. Mast Cells in Cardiac Fibrosis: New Insights Suggest Opportunities for Intervention. *Front Immunol* 2019;10:580.
193. Hawkins RA, Claman HN, Clark RA, Steigerwald JC. Increased dermal mast cell populations in progressive systemic sclerosis: a link in chronic fibrosis? *Ann Intern Med* 1985;102:182–6.
194. Seibold JR, Giorno RC, Claman HN. Dermal mast cell degranulation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1990;33:1702–9.
195. Wilgus TA, Ud-Din S, Bayat A. A Review of the Evidence for and against a Role for Mast Cells in Cutaneous Scarring and Fibrosis. *Int J Mol Sci* 2020;21.
196. Hügler T, White K, van Laar JM. Cell-to-cell contact of activated mast cells with fibroblasts and lymphocytes in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2012;71:1582.
197. Falanga V, Soter NA, Altman RD, Kerdel FA. Elevated plasma histamine levels in systemic sclerosis (scleroderma). *Arch Dermatol* 1990;126:336–8.
198. Arelaki S, Arampatzioglou A, Kambas K, Sivridis E, Giatromanolaki A, Ritis K. Mast cells co-expressing CD68 and inorganic polyphosphate are linked with colorectal cancer. *PLoS One* 2018;13:e0193089.
199. Luca G de, Campochiaro C, Santis M de, et al. Systemic sclerosis myocarditis has unique clinical, histological and prognostic features: a comparative histological analysis. *Rheumatology (Oxford)* 2020;59:2523–33.
200. Gabbiani G. 50 Years of Myofibroblasts: How the Myofibroblast Concept Evolved. *Methods Mol Biol* 2021;2299:1–5.
201. Muhl L, Genové G, Leptidis S, et al. Single-cell analysis uncovers fibroblast heterogeneity and criteria for fibroblast and mural cell identification and discrimination. *Nat Commun* 2020;11:3953.

202. Lynch MD, Watt FM. Fibroblast heterogeneity: implications for human disease. *J Clin Invest* 2018;128:26–35.
203. Baranyi U, Winter B, Gugerell A, et al. Primary Human Fibroblasts in Culture Switch to a Myofibroblast-Like Phenotype Independently of TGF Beta. *Cells* 2019;8.
204. Tallquist MD. Cardiac Fibroblast Diversity. *Annu Rev Physiol* 2020;82:63–78.
205. Sun K-H, Chang Y, Reed NI, Sheppard D. α -Smooth muscle actin is an inconsistent marker of fibroblasts responsible for force-dependent TGF β activation or collagen production across multiple models of organ fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2016;310:L824-36.
206. Plikus MV, Wang X, Sinha S, et al. Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. *Cell* 2021;184:3852–72.
207. Liu T, Warburton RR, Guevara OE, et al. Lack of MK2 inhibits myofibroblast formation and exacerbates pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;37:507–17.
208. Russo I, Cavallera M, Huang S, et al. Protective Effects of Activated Myofibroblasts in the Pressure-Overloaded Myocardium Are Mediated Through Smad-Dependent Activation of a Matrix-Preserving Program. *Circ Res* 2019;124:1214–27.
209. Kanisicak O, Khalil H, Ivey MJ, et al. Genetic lineage tracing defines myofibroblast origin and function in the injured heart. *Nat Commun* 2016;7:12260.
210. Qiao B, Liu X, Wang B, Wei S. The role of periostin in cardiac fibrosis. *Heart Fail Rev* 2024;29:191–206.
211. Kaur H, Takefuji M, Ngai CY, et al. Targeted Ablation of Periostin-Expressing Activated Fibroblasts Prevents Adverse Cardiac Remodeling in Mice. *Circ Res* 2016;118:1906–17.
212. Park JE, Lenter MC, Zimmermann RN, Garin-Chesa P, Old LJ, Rettig WJ. Fibroblast activation protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumor stromal fibroblasts. *J Biol Chem* 1999;274:36505–12.
213. Mathew S, Scanlan MJ, Mohan Raj BK, et al. The gene for fibroblast activation protein alpha (FAP), a putative cell surface-bound serine protease expressed in cancer stroma and wound healing, maps to chromosome band 2q23. *Genomics* 1995;25:335–7.
214. Watanabe M, Fendler WP, Grafe H, et al. Prognostic Implications of (68)Ga-FAPI-46 PET/CT-Derived Parameters on Overall Survival in Various Types of Solid Tumors. *J Nucl Med* 2024;65:1027–34.
215. Bergmann C, Distler JHW, Treutlein C, et al. (68)Ga-FAPI-04 PET-CT for molecular assessment of fibroblast activation and risk evaluation in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease: a single-centre, pilot study. *Lancet Rheumatol* 2021;3:e185-e194.
216. Treutlein C, Distler JHW, Tascilar K, et al. Assessment of myocardial fibrosis in patients with systemic sclerosis using (68)GaGa-FAPI-04-PET-CT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2023;50:1629–35.
217. Rurik JG, Aghajanian H, Epstein JA. Immune Cells and Immunotherapy for Cardiac Injury and Repair. *Circ Res* 2021;128:1766–79.

218. Basalova N, Alexandrushkina N, Grigorieva O, Kulebyakina M, Efimenko A. Fibroblast Activation Protein Alpha (FAP α) in Fibrosis: Beyond a Perspective Marker for Activated Stromal Cells? *Biomolecules* 2023;13.
219. Amrute JM, Luo X, Penna V, et al. Targeting immune-fibroblast cell communication in heart failure. *Nature* 2024;635:423–33.
220. Croft AP, Campos J, Jansen K, et al. Distinct fibroblast subsets drive inflammation and damage in arthritis. *Nature* 2019;570:246–51.
221. Erol Fenercioğlu Ö, Beyhan E, Samancı NŞ, Çermik TF, Ergül N. Pneumonia with Intense (68)Ga-FAPI Uptake Mimicking Metastasis on (68)Ga-FAPI PET/CT in a Patient with Rectal Cancer. *Mol Imaging Radionucl Ther* 2023;32:237–8.
222. Fan M-H, Zhu Q, Li H-H, et al. Fibroblast Activation Protein (FAP) Accelerates Collagen Degradation and Clearance from Lungs in Mice. *J Biol Chem* 2016;291:8070–89.
223. Hazell GGJ, Peachey AMG, Teasdale JE, et al. PI16 is a shear stress and inflammation-regulated inhibitor of MMP2. *Sci Rep* 2016;6:39553.
224. McCartney EE, Chung Y, Buechler MB. Life of Pi: Exploring functions of Pi16+ fibroblasts. *F1000Res* 2024;13:126.
225. Buechler MB, Pradhan RN, Krishnamurty AT, et al. Cross-tissue organization of the fibroblast lineage. *Nature* 2021;593:575–9.
226. Correa-Gallegos D, Ye H, Dasgupta B, et al. CD201(+) fascia progenitors choreograph injury repair. *Nature* 2023;623:792–802.
227. Tsukui T, Sun K-H, Wetter JB, et al. Collagen-producing lung cell atlas identifies multiple subsets with distinct localization and relevance to fibrosis. *Nat Commun* 2020;11:1920.
228. Rius Rigau A, Liang M, Devakumar V, et al. Imaging mass cytometry-based characterisation of fibroblast subsets and their cellular niches in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2024.
229. Cadosch N, Gil-Cruz C, Perez-Shibayama C, Ludewig B. Cardiac Fibroblastic Niches in Homeostasis and Inflammation. *Circ Res* 2024;134:1703–17.
230. Pu X, Zhu P, Zhou X, et al. CD34(+) cell atlas of main organs implicates its impact on fibrosis. *Cell Mol Life Sci* 2022;79:576.
231. Miyahara J, Omata Y, Chijimatsu R, et al. CD34hi subset of synovial fibroblasts contributes to fibrotic phenotype of human knee osteoarthritis. *JCI Insight* 2025;10.

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Univ. Prof. Dr. med. Jörg Distler für die Betreuung dieser Arbeit, Herrn Univ. Prof. Dr. med. Amin Polzin für die Zweitbetreuung sowie Frau Dr. med. Hermina Györfi für die Projektidee, Konzeption und Begleitung des Projektes.

Die Forschungsarbeit wäre ohne die endomyokardialen Biopsien, welchen von Patienten und Patientinnen großzügig für Forschungszwecken zur Verfügung gestellt wurden, nicht möglich gewesen. Daher soll an dieser Stelle auch in besonderer Weise den anonymen Patienten und Patientinnen gedankt werden. Der Großteil der Gewebeproben wurde in einer Kooperation mit Herrn Prof. Giacomo De Luca, Herrn Dr. Cosimo Bruni, Frau Dr. Veronica Batani, Frau Prof. Christina Basso und Herrn Prof. Marco Matucci-Cerinic zur Verfügung gestellt. Molte grazie per questo ai nostri partner italiani!

Für die Unterstützung beim experimentellen Teil und die Messung danke ich insbesondere Frau Bilgesu Safak Tümerdem, Frau Veda Devakumar und Herrn Dr. rer. nat. Aleix Rius Rigau.

Für Hilfe bei der Datenanalyse gilt mein Dank im Besonderen Herrn Dr. PH Tim Filla, Herrn Dr. rer. nat. Yi-Nan Li und Herrn Dr. med. Alexandru-Emil Matei.

Für stetigen wissenschaftlichen Rat und beständige Ermutigung möchte ich zu guter Letzt Herrn PD Dr. med. Wolfgang Merkt danken.